



Mariana Crua Monteiro

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

Espectroscopia Raman e técnicas complementares no diagnóstico e intervenção em lesões do tecido dentário

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno, Professora Auxiliar Convidada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Professora Doutora Ana Filipa Marques Chasqueira, Professora Auxiliar Convidada, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

Espectroscopia Raman e técnicas complementares no diagnóstico e intervenção em lesões do tecido dentário

Copyright © Mariana Crua Monteiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicado à minha querida avó Lurdes.

Sempre chega a hora em que
descobrimos que sabíamos muito
mais do que antes julgávamos.

José Saramago

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno, pelo constante apoio, dedicação e preocupação em todo este percurso, por toda a partilha de experiências e conhecimentos essenciais ao desenvolvimento desta investigação.

À co-orientadora, Professora Doutora Ana Filipa Marques Chasqueira, a quem agradeço toda a disponibilidade, apoio e troca de conhecimentos.

À professora Maria Luísa Carvalho, coordenadora do laboratório, pelo apoio e preocupação em gerar o ambiente e recursos necessários ao nosso estudo.

A todos os outros professores que, directa ou indirectamente, intersectaram o meu percurso e puderam contribuir para o meu desenvolvimento académico e pessoal.

Aos médicos dentistas, Dr. Aurélio Gaudensi Costa, Dr. Óscar da Costa e, em especial, ao Dr. José Alegria, pela disponibilidade em fornecer amostras para o meu trabalho.

Aos companheiros de laboratório Tânia, Mariana, Marta, Gonçalo e Tiago, por terem proporcionado o melhor ambiente de trabalho possível nestes últimos tempos recheado de apoio, paciência e entreaajuda.

Aos meus queridos Pais e Avô, pelo apoio e esforço incondicionais, pelos valores e educação que hoje me caracterizam e pela constante confiança em mim e naquilo de que sou capaz. Ao meu irmão, pelo companheirismo, paciência, e tudo aquilo que as palavras não são suficientes para descrever. À restante família e, em especial, à amiga e prima Joana, pelo apoio e amizade.

Aos amigos para a vida que a faculdade me proporcionou, em especial à Mafalda, Pia, Rita, Gabi, Sara, Mimi, Nocas, Patrícia, Leo e Ana Lúcia, por terem sido os fiéis amigos neste percurso, a quem não sei como agradecer o apoio, amizade e entreaajuda nos bons e maus momentos.

Aos últimos companheiros de casa, Bia, Maria e Zé, por terem sido uma fonte constante de amizade, apoio, paciência, força e animação, por terem sido a minha segunda família durante este percurso.

A todos eles, do fundo do coração, um muito obrigada.

Resumo

A cárie dentária é o maior motivo de preocupação no que diz respeito à saúde oral e consequente bem estar da população mundial. O tratamento deste tipo de lesão engloba procedimentos restauradores que são bastante comuns na prática clínica em Medicina Dentária. No entanto, essa solução é associada a um estágio relativamente avançado da doença pois o seu estado inicial pode ser de fácil reversão desde que diagnosticado atempadamente. Apesar do avanço tecnológico nesta área da ciência, o desenvolvimento de ferramentas que permitam o diagnóstico precoce da lesão de cárie é ainda um campo de estudo em evolução.

Este trabalho tem como principais objectivos a utilização e optimização da técnica de microscopia Raman como ferramenta no diagnóstico precoce e tratamento de lesões de cárie. Desta forma, a investigação foi dividida em dois estudos: A – caracterização de diferentes tecidos dentários e os seus diferentes graus de integridade com recurso à espectroscopia Raman e comparação com as imagens obtidas por Radiografia Digital e Microscopia Digital com iluminação de radiação Ultra-Violeta (UV); e B – avaliação da profundidade de infiltração de uma resina infiltrante (Optibond FL®) na intervenção em lesões de cárie tipo *white spot*.

Os resultados obtidos comprovaram que o diagnóstico de lesões de cárie por análise radiográfica é menos preciso do que a observação da fluorescência induzida por iluminação UV ou o aumento da razão de despolarização (RD) da banda de alongamento simétrico do ião fosfato (PO_4^{3-}) da molécula de hidroxiapatite nas regiões com cárie.

Relativamente à análise realizada aos espécimes submetidos ao procedimento infiltrante, determinou-se uma profundidade média de infiltração de 17 μm . Este resultado é promissor no sentido em que estas resinas facilmente acessíveis podem ser utilizadas em substituição de produtos dispendiosos que existem no mercado com o objectivo de preencher as porosidades do esmalte desmineralizado, impedindo a progressão da lesão e disfarçando-a, esteticamente.

Palavras-chave: lesão de cárie, Espectroscopia Raman, razão de despolarização, Radiografia Digital, Microscopia Digital

Abstract

Dental caries is the biggest reason for concern regarding oral healthcare and the consequent well-being of the world population. The treatment of such lesion consists mainly on restorative procedures which are quite common in Dentistry clinical practice. However, this solution is performed in a relatively advanced stage of the disease because, when early diagnosed, the lesion can be easily reversed. Despite the technological advance in this research field, the development of tools for early caries lesions diagnosis is still a field of study in evolution.

This work's main objective was the optimization and application of the Raman microscopy technique as a tool in the early diagnosis and treatment of carious lesions. Thus, the research was divided into two studies: A – Characterization of different dental tissues and their different degrees of integrity using Raman spectroscopy and comparison with the images acquired with digital radiography and digital microscopy with ultraviolet (UV) illumination; and B – evaluation of the infiltration depth of an infiltrating resin (Optibond FL®) in the white spot carious lesions approach.

The results obtained showed that carious lesions diagnosis by radiographic analysis is much less precise than the observation of UV induced fluorescence or the increase of depolarization ratio (RD) of the hydroxyapatite molecule phosphate ion (PO_4^{3-}) symmetric stretch band in the caries regions.

Regarding the analysis performed on specimens submitted to the infiltrating procedure, a mean depth of infiltration of 17 μm was determined. This result is promising considering these easily accessible resins can be used in replacement of costly products on the market with the aim of filling the enamel demineralized porosity in order to prevent lesions from progressing and to aesthetically disguise it.

Keywords: carious lesion, Raman Spectroscopy, depolarization ratio, Digital Radiography, Digital Microscopy

Índice de Conteúdos

Agradecimentos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract	xiii
Índice de Conteúdos	xv
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas	xxiii
Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos.....	xxv
1. Introdução	1
1.1. Contextualização do tema	2
1.2. Objectivos	3
1.2.1. Gerais.....	3
1.2.2. Específicos.....	3
2. O Dente	5
2.1. Anatomia e Histologia do dente.....	6
2.1.1. Esmalte	6
2.1.2. Dentina.....	7
2.1.3. Polpa.....	8
2.1.4. Cimento	8
2.2. Cárie Dentária	8
2.2.1. Esmalte com lesão de cárie	10
2.2.2. Dentina com lesão de cárie	10
2.2.3. Tratamento clínico de lesões de cárie	11
2.2.4. Intervenção em lesões incipientes com resinas infiltrantes	11
3. Interação da Radiação com a Matéria	13
3.1. Radiação Electromagnética	13

3.2.	Processos de interacção dos fótons com a matéria	14
3.2.1.	Dispersão de Rayleigh.....	15
3.2.2.	Efeito Fotoeléctrico.....	16
3.2.3.	Dispersão de Compton.....	16
3.2.4.	Produção de Pares.....	17
4.	Estado da Arte	19
5.	Técnicas Analíticas.....	25
5.2.	Espectroscopia Raman.....	25
5.2.2.	Efeito de Raman	25
5.2.3.	Microscópio Raman Confocal	28
5.2.4.	Vantagens e Desvantagens da técnica.....	29
5.3.	Radiografia Digital.....	30
6.	Materiais e Métodos.....	33
6.1.	Seleccção das amostras.....	33
6.2.	Preparação dos espécimes	34
6.2.1.	Corte.....	34
6.2.1.1.	Corte dos espécimes para o estudo A	34
6.2.1.2.	Corte dos espécimes para o estudo B	34
6.2.2.	Protocolo de aplicação da resina infiltrante	35
6.2.3.	Preparação dos Espécimes para Análise Espectroscópica (μ -Raman) e registo de imagem.....	35
6.3.	Registo de imagem.....	36
6.3.1.	Microscópio Digital DinoLite	36
6.3.2.	Lupa Binocular	36
6.3.3.	Radiografia Digital.....	36
6.4.	Setup Experimental μ -Raman Confocal.....	37
6.5.	Razão de Despolarização (RD).....	38
7.	Apresentação, Análise e Discussão de Resultados.....	39
7.2.	Estudo A.....	39

7.3. Estudo B	55
8. Considerações Finais e Perspectivas Futuras	61
9. Divulgação.....	63
10. Referências Bibliográficas.....	65
Apêndice I.....	71
Apêndice II	73
Apêndice III.....	75
Apêndice IV.....	77
Apêndice V	79

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Imagem representativa da dentição permanente (a)) e das várias superfícies do dente consoante a orientação no interior da cavidade oral (b)) [12][13].	5
Figura 2.2 – Imagem representativa do corte transversal de um dente incisivo e suas estruturas [17].	6
Figura 2.3. – Túbulos na superfície da dentina (A) são mais pequenos e mais dispersos comparativamente com a dentina mais funda (B). Túbulos na superfície da dentina radicular (C) e na sua profundidade (D) onde são mais pequenos e pouco numerosos comparativamente com a porção coronal da dentina [2].	7
Figura 2.4 – Figura representativa de um corte transversal de um dente molar cariado apresentando a evolução da cárie dentária desde o esmalte até à polpa [19].	9
Figura 2.5 – Esquema das reacções ocorridas entre os tecidos e o meio intraoral a) no processo de desmineralização antes do procedimento e b) depois do procedimento infiltrante [29].	11
Figura 3.1 – Representação do espectro electromagnético. Adaptado de [35].	13
Figura 3.2 – Predominância de fenómeno de interacção da radiação com a matéria com a energia e o número atómico [34].	15
Figura 3.4 – Esquematização das interacções durante o efeito fotoeléctrico. Adaptado de [36].	16
Figura 3.5 – Representação esquemática das interacções durante a dispersão de Compton. (Adaptado de [40]).	17
Figura 3.6 – Representação esquemática das interacções durante a produção de pares. (adaptado de [42]).	17
Figura 5.1 – Representação esquemática das transições possíveis para uma molécula (adaptado de [68], [69]).	26
Figura 5.2 – Exemplos de espectros de Raman de uma mesma amostra excitada com várias energias. [49].	27
Figura 5.3 – Imagem representativa dos principais componentes de um aparelho de microscopia Raman confocal [73].	29
Figura 6.1 – Fotografia de três das oito amostras seleccionadas.	33
Figura 6.2 – Esquema de corte das amostras para ambos os estudos A e B (adaptada de [76]).	34
Figura 6.3 – Fotografia dos espécimes B1 a B3 depois do procedimento infiltrante.	35

Figura 6.4 - Fotografia do espectrómetro μ -Raman Confocal no Laboratório 120, DF/FCT-NOVA.	37
Figura 7.1 – Imagens adquiridas para o espécime A5.	40
Figura 7.2 – Imagens adquiridas para o espécime A1 com lesão branca..	41
Figura 7.3 – Imagens adquiridas para o espécime A7.	42
Figura 7.4 – Imagens adquiridas para um espécime hígido.	43
Figura 7.5 – Imagens adquiridas para os espécimes A6 (cima) e A8 (baixo).....	44
Figura 7.6 – Conjunto de espectros obtidos por espectroscopia Raman para a) esmalte saudável e para b) esmalte cariado.....	46
Figura 7.7 – Conjunto de espectros obtidos desde dentina sã até dentina cariada através da espectroscopia Raman.....	47
Figura 7.8 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A5.....	48
Figura 7.9 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A6.....	49
Figura 7.10 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A3.....	50
Figura 7.11 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5.....	51
Figura 7.12 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5.....	52
Figura 7.13 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A6.....	52
Figura 7.14 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A4.....	53
Figura 7.15 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5.....	54
Figura 7.16 – Espectro Raman obtido para a resina infiltrante (Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s).	55
Figura 7.17 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B1.	56
Figura 7.18 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B2.	57
Figura 7.19 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B3.	58
Figura 9.1 – Poster apresentado no 2 nd NOVA Biomedical Engineering Workshop.....	63
Figura A.II.1 – Imagens adquiridas para o espécime A3 com lesão branca.	73
Figura A.II.2 – Imagens adquiridas para o espécime A8.....	74
Figura A.III.1 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A2.....	75

Figura A.III.2 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra B2	76
Figura A.IV.1 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A1	77
Figura A.IV.2 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A2.	77
Figura A.IV.3 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A3.	78
Figura A.IV.4 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A3	78
Figura A.V.1 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha A da amostra B1.	79
Figura A.V.2 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B1.	79
Figura A.V.3 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha C da amostra B2.	80
Figura A.V.4 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B2.	80
Figura A.V.5 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha E da amostra B2.	81
Figura A.V.6 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha A da amostra B3.	81
Figura A.V.7 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B3.	82
Figura A.V.8 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha C da amostra B3.	82
Figura A.V.9 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha E da amostra B3.	83

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Lista de comprimento de onda e energia para cada tipo de radiação. Adaptado de [34].....	14
Tabela 4.1 – Métodos de detecção de cárie tendo por base os seus princípios físicos[9].	19
Tabela 7.1 – Profundidade da lesão medida com o software DinoCapture 2.0 e profundidade de infiltração para todas as linhas adquiridas para os três espécimes.....	59
Tabela A.I.1 – Composição da resina composta e da resina hidrofóbica utilizadas.	71

Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

μ -EDXRF	Micro Fluorescência de Raios X dispersiva em Energia
μ -Raman	Micro-Raman
3D	Três Dimensões
BIS-GMA	Bisfenol-A-glicidilmetacrilato
Ca	Cálcio
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatite
CCD	Do inglês <i>Charge-Coupled Device</i>
DF	Departamento de Física
EUA	Estados Unidos da América
FCT-NOVA	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
FMDUL	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
JAD	Junção amelodentinária
Kr ⁺	Kripton
LED	Do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MD	Microscópio Digital
MEV	Microscopia Electrónica de Varrimento
PO_4^{3-}	Ião fosfato
RD	Razão de Despolarização
SiC	Carbeto de Silício
TCO	Tomografia Coerência Óptica
u.a.	Unidades arbitrárias
UICOB	Unidade de investigação em Ciências Orais e Biomédicas
UV	Ultravioleta

1. Introdução

Nos dias de hoje, a estética e a aparência são dois aspectos que movem cada vez mais a sociedade e que promovem o seu bem-estar. Um dos problemas que mais afecta o sorriso é a cárie dentária, sendo, por isso, de grande importância a criação de métodos mais refinados para o seu diagnóstico[1]. Para tal, o conhecimento das estruturas dentárias e as relações entre si e com as estruturas de suporte é fundamental. A forma do dente, o seu contorno e as relações acima mencionadas são factores determinantes[2].

O primeiro sinal de lesão de cárie é o aparecimento de uma mancha branca opaca na superfície do dente, denominada *white spot*, que, apesar de ser um transtorno estético, pode atingir a dentina evoluindo para uma lesão mais profunda e até cavitada caso não se proceda atempadamente ao seu controlo[3].

Na prática clínica recorrente, o diagnóstico de lesões de cárie baseia-se na avaliação visual, táctil (com sonda exploradora) e radiográfica que, na maioria das vezes, formam um conjunto de procedimentos adequado à detecção de cáries avançadas de dimensões bastante significativas mas insuficientes nos estágios iniciais[4][5]. Tendo em conta que, para que sejam visíveis alterações na estrutura dentária através de imagem radiográfica, é necessário que cerca de 30 a 40% da sua estrutura já se encontre desmineralizada, surge a necessidade de complementar este método actual com outras técnicas, nomeadamente técnicas de imagem que recorram a outros tipos de radiação[6].

O tratamento tradicional das lesões de cáries passa pela remoção de toda a estrutura dentária cariada antes da aplicação dos materiais restauradores, o que muitas vezes implica a remoção de mais estrutura do que o necessário e pode, a longo prazo, não ter o sucesso desejado[7]. No entanto, os profissionais da medicina dentária têm-se tornado cada vez mais conservadores relativamente à quantidade de tecido a remover neste procedimento[8]. Além disso, a aplicação de materiais restauradores só se justifica em lesões de cariz relativamente avançado ao passo que as iniciais podem ser reversíveis e controladas através de remineralização, o que justifica a importância da sua detecção precoce.

O constante insucesso na detecção de cáries em estágio inicial tem sido convertido numa abordagem mínima no que toca às terapias de remineralização[9]. Como tal, aí surgiu a vertente inovadora do presente estudo ao englobar o teste de um agente

infiltrante que poderá vir a simplificar a abordagem de lesões iniciais na superfície do esmalte.

Dado que este dano nos tecidos dentários está associado a alterações na mineralização dos dentes e que o fosfato mineral que os compõe proporciona um sinal forte na espectroscopia Raman, esta técnica torna-se poderosa no complemento ao diagnóstico[10].

Desta forma, através dessa e de outras técnicas complementares de diagnóstico, a investigação descrita visa a caracterização estrutural e morfológica de tecidos dentários com e sem lesão, bem como a avaliação de um procedimento com resina infiltrante.

1.1. Contextualização do tema

A Engenharia Biomédica pauta-se por ser uma área extremamente versátil com conhecimentos em diversos campos da engenharia e das ciências, aliados à tecnologia. A sua aplicação na identificação e análise de problemas de natureza médica revela-se ser uma mais-valia para a sua resolução e aperfeiçoamento.

De facto, a aparência individual e, mais concretamente, a saúde oral tem sido crescentemente alvo de preocupação na sociedade, pelo que a investigação neste tema, recorrendo ao fenómeno físico do efeito Raman, poderá convergir em novos conhecimentos para a área da Medicina Dentária. Considerando que este trabalho de investigação visa a caracterização mais aprofundada dos tecidos dentários, os resultados dele advindos poderão vir a contribuir com alguns pormenores decisivos no tratamento das cáries dentárias e nos demais tratamentos realizados hoje em dia, possibilitando uma maior qualidade e, conseqüentemente, longevidade dos mesmos.

1.2. Objectivos

1.2.1. Gerais

O objectivo principal deste trabalho consiste na utilização e optimização da técnica de microscopia Raman como ferramenta na investigação em Medicina Dentária. Considerando como principais áreas de estudo o diagnóstico precoce de lesões de cárie e o tratamento destas, dividiu-se o trabalho em dois grupos de estudo:

Estudo A – Utilização da espectroscopia Raman no diagnóstico de diversos estágios de lesão de cárie e comparação com técnicas complementares de imagem;

Estudo B - Avaliação da performance de uma resina infiltrante na intervenção de lesões de cárie tipo *white spot* através de espectroscopia Raman.

1.2.2. Específicos

Estudo A:

- Caracterizar espectroscopicamente os diferentes tecidos dentários e os seus diferentes graus de integridade;
- Calcular a Razão de Despolarização em auxílio à discriminação de zonas sãs e cariadas;
- Comparar os resultados obtidos por Raman com as imagens obtidas por Radiografia Digital e por Microscopia Digital com iluminação UV.

Estudo B:

- Aplicar a resina infiltrante como método de intervenção e avaliar a sua profundidade de infiltração.

2. O Dente

A espécie humana é conhecida por possuir dois tipos de dentição ao longo da sua vida: a primária/decídua e a permanente. A primária, que se começa a formar por volta dos 6 meses de idade, consiste em 10 dentes maxilares (arcada superior) e 10 dentes mandibulares (arcada inferior). Por volta dos 6 anos de idade até aproximadamente aos 13, esta primeira é substituída pela dentição permanente que corresponde a 16 dentes maxilares (arco superior) e a 16 mandibulares (arco inferior), perfazendo o total de 32 dentes como se pode observar na figura 2.1[2][11].

Os dentes são classificados com base na sua morfologia que, por sua vez, está relacionada com a função que apresentam. Ambas as dentições apresentam os incisivos, caninos e molares, mas um quarto tipo vem tornar a dentição permanente um pouco mais complexa, os pré-molares[2].

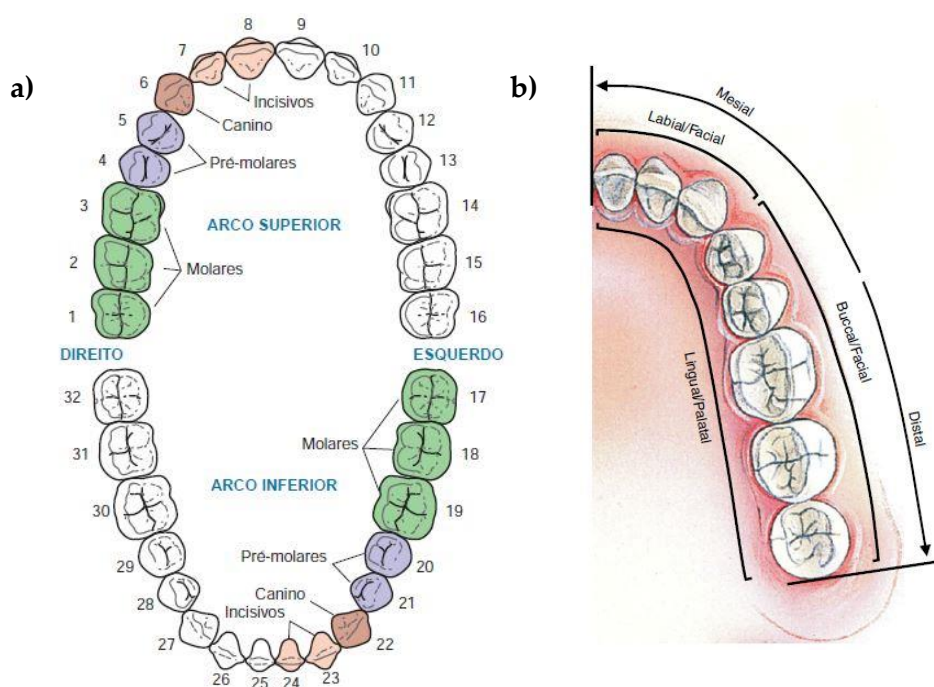


Figura 2.1 – Imagem representativa da dentição permanente (a)) e das várias superfícies do dente consoante a orientação no interior da cavidade oral (b)) [12][13].

2.1. Anatomia e Histologia do dente

Do ponto de vista anatómico, o dente é formado por duas partes distintas: coroa e raiz (figura 2.2). A coroa anatómica é todo o volume desde a superfície do dente até à junção amelo-cementária¹, sendo que a porção visível e brilhante situada acima dos ossos de suporte e da gengiva, responsável pela mastigação, tem o nome de coroa clínica[11][14].

Imediatamente a baixo da coroa encontra-se a raiz que actua como elemento fixador inserida numa cavidade óssea designada alvéolo. A ligação entre a raiz e o osso alveolar é mediada pelo ligamento periodontal e estes, juntamente com o cimento (invólucro externo da raiz), formam o periodonto – conjunto dos tecidos que suportam o dente e atenuam o impacto das forças mastigatórias[14]–[16].

Em termos histológicos, o dente é composto por esmalte, dentina, polpa e cimento[11].

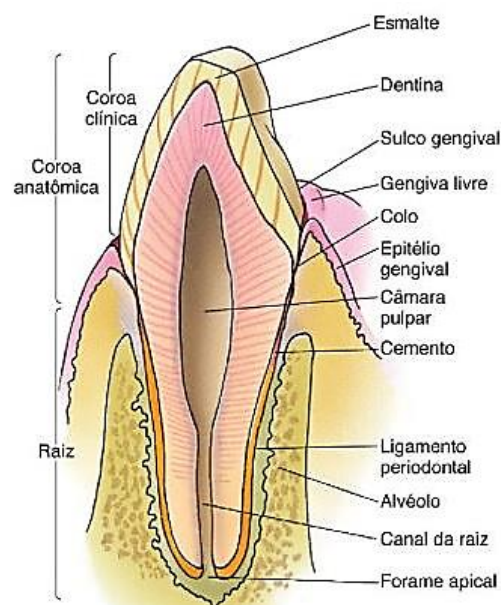


Figura 2.2 – Imagem representativa do corte transversal de um dente incisivo e suas estruturas[17].

2.1.1. Esmalte

Este tecido forma uma capa protectora, de espessura variável, sobre a coroa anatómica. É relativamente translúcido e a sua aparência depende da espessura local que, por sua vez, é afectada pela cor da dentina, tecido que lhe está subjacente[2][13].

¹ Transição entre esmalte e cimento.

Quimicamente, é constituído por matéria inorgânica em 96%, maioritariamente fosfato de cálcio em forma de cristais de hidroxiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, matéria orgânica e água nos 4% restantes, que faz dele o tecido mais duro do organismo e, portanto, bastante adequado para a mastigação[2], [11], [14], [18].

Os cristais de hidroxiapatite estão organizados sob forma de prismas que se estendem desde a junção amelodentinária (JAD)² até à superfície do dente e que foram formados por células especializadas, os ameloblastos[13]–[15]. Apesar dessas células estarem presentes na superfície do esmalte durante toda a sua formação, quando o dente erupciona elas são perdidas. Esse tecido é, então, acelular e, consequentemente, desprovido de qualquer capacidade de regeneração após perda de estrutura por desgaste, fractura ou cárie[15], [16], [18].

2.1.2. Dentina

Tecido branco-amarelado, mineralizado, avascular e elástico que constitui a maior parte da estrutura do dente. Apesar de ser menos resistente que o esmalte, a dentina é bastante elástica, tornando-se no suporte ideal para aquele.

Quimicamente, é composta em 30% por água e uma matriz orgânica à base de colagénio do tipo I e, nos restantes 70%, por matéria inorgânica, mais concretamente de cristais de hidroxiapatite[15][18].

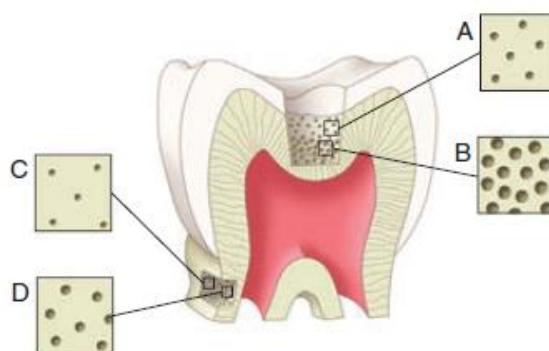


Figura 2.3. – Túbulos na superfície da dentina (A) são mais pequenos e mais dispersos comparativamente com a dentina mais funda (B). Túbulos na superfície da dentina radicular (C) e na sua profundidade (D) onde são mais pequenos e pouco numerosos comparativamente com a porção coronal da dentina[2].

Este tecido é atravessado em toda a sua espessura por milhões de túbulos (figura 2.3), que contêm no seu interior os prolongamentos citoplasmáticos das células que lhe deram

² Transição entre esmalte e dentina, composta por matrizes dos dois tecidos.

origem, os odontoblastos[11][16].

2.1.3. Polpa

A dentina delimita uma cavidade, a cavidade pulpar, onde se aloja a polpa dentária. Enquanto que todas as outras formações são duras e calcificadas, a polpa é o único tecido mole do dente. Constituída por vasos e nervos, é o tecido vascular/"vivo" do dente[11], sendo dotada de propriedades imunológicas e regenerativas que asseguram a vitalidade deste[13].

Apesar de serem dois tecidos destintos, do ponto de vista embrionário e funcional, a polpa e a dentina devem ser consideradas um conjunto, denominado complexo dentino-pulpar, dado que a dentina contém prolongamentos de células do tecido pulpar no seu interior[2][16].

2.1.4. Cimento

Camada fina de tecido dentário mineralizado que cobre as raízes dos dentes e é formado por células denominadas cementoblastos. Começa na região cervical do dente, na junção amelo-cementária, e prolonga-se até à zona apical. É um tecido conjuntivo e especializado constituído por 45-50% de cristais de hidroxiapatite e cerca de 50-55% de matéria orgânica (colagénio) e água. Apesar de partilharem algumas características físicas, químicas e estruturais, ao contrário do osso, o cimento não é vascularizado[2][11].

Este tecido é formado continuamente ao longo do tempo, uma vez que, à medida que a camada inicial envelhece, uma nova é depositada em cima para assegurar que a sua função é desempenhada em plenitude[2].

2.2. Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença oral transmissível e infecciosa que provoca a destruição local, total ou parcial, de uma estrutura dentária[2].

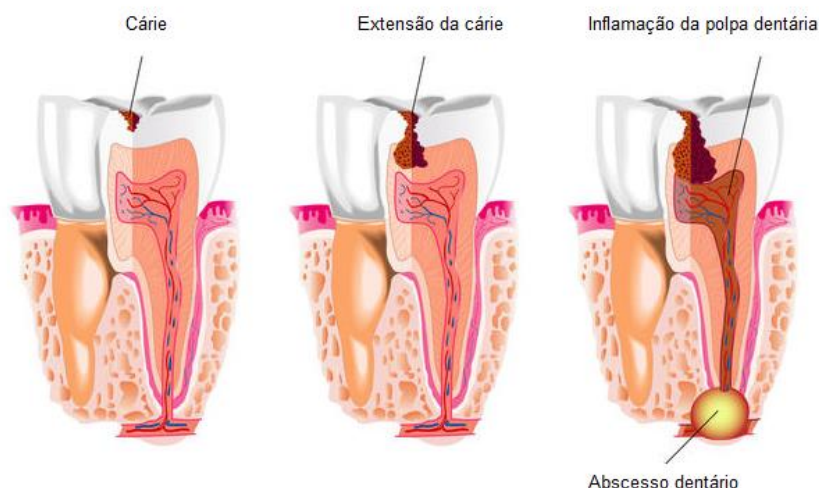


Figura 2.4 – Figura representativa de um corte transversal de um dente molar cariado apresentando a evolução da cárie dentária desde o esmalte até à polpa[19].

O processo patológico inicia-se com alterações na composição e na actividade metabólica do biofilme, que consiste numa massa acumulada na superfície do dente composta por bactérias da saliva[20].

A principal causa desta degradação do dente prende-se com a interacção desse biofilme (ou placa bacteriana) com os hidratos de carbono ingeridos na alimentação[2], [20]. Os microrganismos (maioritariamente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, mas também várias espécies de *Lactobacillus*[21]) presentes no biofilme fermentam os hidratos de carbono e, por conseguinte, produzem ácidos orgânicos[22]. Caso esses ácidos se mantenham algum tempo neste ecossistema, podem vir a provocar a diminuição do pH do biofilme para níveis críticos levando à passagem de cálcio e fosfato do dente para a placa bacteriana com o intuito de manter o equilíbrio e, consequentemente, originando a desmineralização do dente[2][23]. Caso o valor de pH seja restabelecido, o cálcio e fosfato entram em saturação e parte destes compostos é adicionado novamente ao esmalte, ou seja, ocorre a remineralização[2].

A saliva é o melhor sistema de defesa contra os factores causadores desta lesão e o equilíbrio entre a desmineralização e a remineralização é constantemente afectado por esta interacção da saliva com os agentes agressores[22].

As cáries podem surgir em sulcos e fissuras ou em superfícies lisas. Podem ser cavidades ou não-cavidades dependendo se existe ou não perda de estrutura física do dente[20]. De acordo com Selwitz *et al.*, visivelmente, a cavidade que se forma já é um sinal do estado avançado da doença uma vez que o processo já tem vindo a evoluir muito antes do seu aparecimento[21].

Esta doença pode ocorrer tanto ao nível da coroa como da raiz, maioritariamente nas zonas de difícil acesso com os meios de higiene oral disponíveis, e pode desmineralizar o esmalte, a dentina e o cimento, manifestando-se clinicamente de maneiras diferentes.

2.2.1. Esmalte com lesão de cárie

O primeiro sinal de lesão de cárie no esmalte detectável à vista desarmada é a lesão branca - *white spot*. O seu aparecimento é prematuro, inicial ou incipiente[20]. É caracterizada por ser uma zona não-cavitada e branco opaca. Esta perda de translucidez deve-se à porosidade provocada pela desmineralização que ocorreu na região[2].

Se a superfície do esmalte permanecer intacta e a infecção bacteriana cessar, haverá predomínio da remineralização e consequente restauração da integridade do tecido[16]. Caso contrário, a infecção irá evoluir podendo atingir a dentina com possível colapso do esmalte e aparecimento de uma lesão cavitada[13].

No entanto, a lesão branca é reversível no seu estado prematuro. Se forem adoptadas medidas de prevenção adequadas que permitam a remineralização da zona afectada, a progressão da lesão pode ser interrompida passando de uma região baça e áspera (lesão activa) a uma região brilhante e suave (lesão inactiva)[24].

2.2.2. Dentina com lesão de cárie

Caso atinja a dentina, a lesão progride de forma rápida ao longo da JAD seguindo a direcção dos túbulos que fornecem um óptimo caminho para o avanço das bactérias. A lesão adquire a forma de um cone com o vértice no sentido da polpa[2][25].

Uma vez que a dentina apresenta menor resistência do que o esmalte, por ser menos mineralizada, a cárie avança mais facilmente nesse tecido. Aí podem distinguir-se diferentes zonas, nomeadamente uma camada mais superficial de dentina infectada e uma camada mais profunda de dentina afectada[26].

A dentina infectada encontra-se desmineralizada e sem capacidade de remineralização, além de apresentar o colagénio com a sua estrutura desnaturada. Em contrapartida, a dentina afectada subjacente, apresenta-se livre de microrganismos, desmineralizada mas com capacidade de se remineralizar e possui colagénio não desnaturado, logo, ainda viável mas com estrutura cristalina alterada tornando-a um pouco mais macia que a dentina sã [25] [26].

Se não for diagnosticada e tratada a tempo, a lesão poderá progredir para a polpa e

até causar a sua necrose (figura 2.4)[19].

2.2.3. Tratamento clínico de lesões de cárie

Até ao início do século XX, o tratamento mais utilizado das lesões de cárie passava pela extracção completa da estrutura dentária. Esse procedimento foi, então, substituído pela restauração do tecido dentário perdido. Até aos dias de hoje, esse continua a ser o método preferencial na clínica. Caso a lesão seja detectada num estado avançado, é necessário remover o tecido infectado com consequente intervenção restauradora que permite a preservação da estrutura do dente. As restaurações efectuadas podem ser de baixa durabilidade e, caso o tecido infetado não seja totalmente removido antes da sua aplicação, pode ocorrer formação de nova lesão subjacente.

No entanto, nos últimos 30 anos a abordagem a estas lesões tem sido cada vez mais de cariz preventivo uma vez que, na maioria da população, o avanço da cárie é um processo relativamente lento. Desta forma, o controlo do biofilme, a aplicação de flúor ou a aplicação de selantes de fissura têm sido estratégias com relativo sucesso na prevenção e numa abordagem inicial, evitando, assim, procedimentos mais invasivos[21].

2.2.4. Intervenção em lesões incipientes com resinas infiltrantes

Nos últimos 10 anos têm sido desenvolvidas várias abordagens de cariz preventivo e não invasivas para lesões iniciais não cavitadas, desde os seus primeiros sinais de desmineralização[27]. Os selantes de fissura, mais utilizados na clínica, proporcionam uma protecção apenas superficial ao nível do sistema de fissuras das superfícies oclusais do esmalte, ao passo que as técnicas desenvolvidas mais recentemente com base em resinas infiltrantes permitem uma intervenção em profundidade e em qualquer tipo de superfície dentária[28].

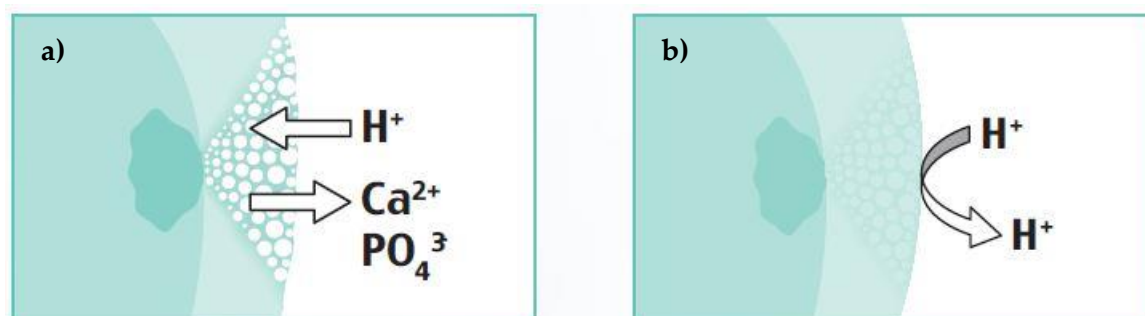


Figura 2.5 – Esquema das reacções ocorridas entre os tecidos e o meio intraoral a) no processo de desmineralização antes do procedimento e b) depois do procedimento infiltrante[29].

A infiltração de resinas em esmalte com lesão branca tem o objectivo de preencher a porosidade originada pelo processo de desmineralização (subfigura 2.5 a)) prevenindo o seu progresso. A resina, idealmente de baixa viscosidade, penetra no esmalte e bloqueia a passagem dos ácidos que dissolvem o conteúdo mineral (subfigura 2.5 b)). Para que tenha sucesso, estas técnicas devem ser precedidas pelo condicionamento da superfície da lesão, uma vez que esta é caracterizada pela presença de uma camada superficial de esmalte mineralizado que sobrepõe a região mais desmineralizada e porosa da lesão[30]. Depois de polimerizada, a resina estabiliza mecanicamente a estrutura de hidroxiapatite fragilizada prevenindo o seu colapso[31][32][33]. Este procedimento permite que a lesão retome a sua cor e translucidez normais semelhantes ao esmalte saudável[32], uma vez que os tecidos infiltrados irão interagir com a radiação incidente de forma diferente alterando a sua percepção visual e permitindo disfarçar a lesão esteticamente.

Apesar de se revelar uma abordagem bastante promissora para este tipo de lesões, as investigações científicas realizadas até à data são reduzidas e carecem de desenvolvimento, nomeadamente, no que diz respeito à qualidade e durabilidade dos procedimentos[27].

3. Interacção da Radiação com a Matéria

3.1. Radiação Electromagnética

Radiação electromagnética pode ser definida como energia em movimento emitida por uma determinada fonte, caracterizando-se por oscilações de campos magnéticos e eléctricos perpendiculares entre si. Conforme a sua frequência e comprimento de onda, é possível organizar os tipos de radiação num espectro electromagnético, representado na figura 3.1[34] [42].

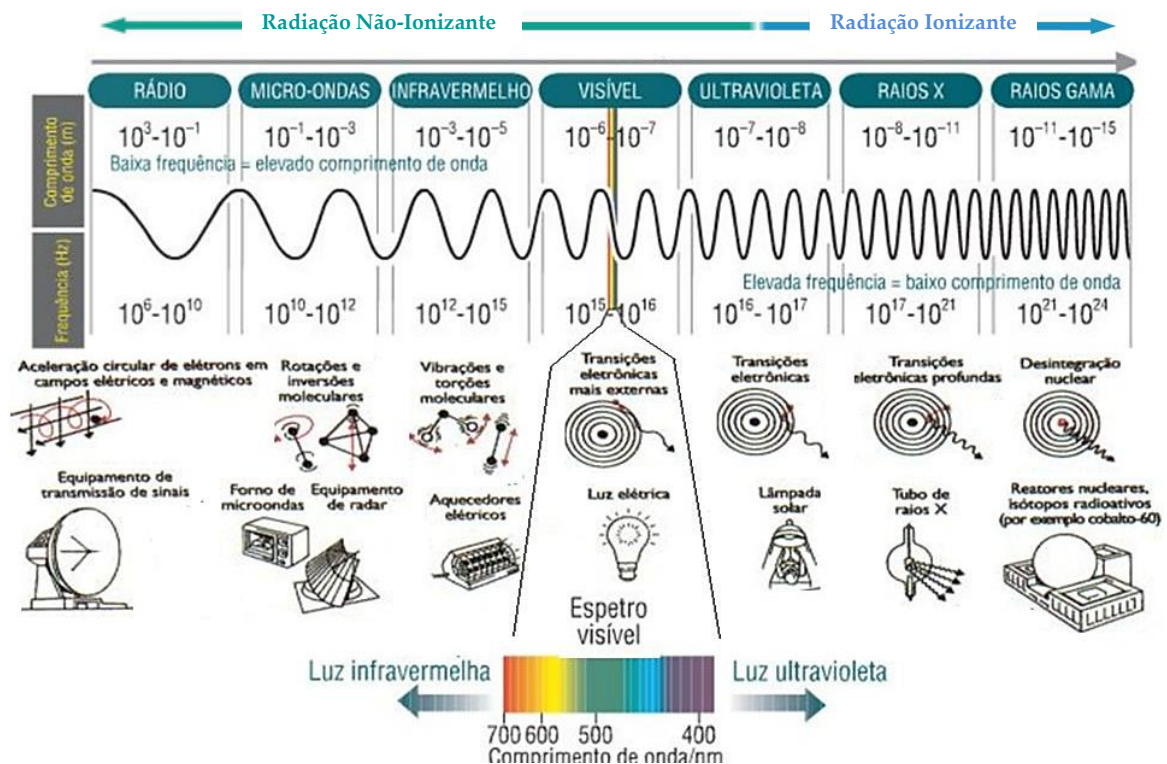


Figura 3.1 – Representação do espectro electromagnético. Adaptado de [35]

De acordo com a sua energia, a radiação pode ser ionizante ou não ionizante consoante a sua capacidade de ionizar o meio por onde passa, i.e provocar ejeção de electrões dos átomos[34]. É possível proceder ao cálculo dessa energia com recurso às características dos fotões que a compõem através da equação 3.1

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (\text{Equação 3.1})[34]$$

Sendo E a energia do fotão, h a constante de Planck ($4,14 \times 10^{-15}$ eV.s), ν a frequência, c a velocidade da luz ($2,9979 \times 10^8$ ms⁻¹) e λ o comprimento de onda.

As energias para os vários tipos de radiação estão representadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Lista de comprimento de onda e energia para cada tipo de radiação. Adaptado de [34]

Radiação electromagnética	Comprimento de Onda	Energia do fotão (eV)
Raios X e gama	< 100 nm	> 12
Ultravioleta UVC	100 nm – 280 nm	12,42 – 4,42
UVB	280 nm – 315 nm	4,42 – 3,94
UVA	315 nm – 400 nm	3,94 – 3,10
Luz visível	400 nm – 700 nm	3,10 – 1,77
Infravermelho IVA	700 nm – 1,4 μm	1,59 – 0,88
IVB	1,4 μm – 3 μm	0,88 – 0,414
IVC	3 μm – 1 mm	0,414 – $1,24 \times 10^{-3}$

3.2. Processos de interacção dos fotões com a matéria

Normalmente, ao interagir com a matéria, o feixe incidente deposita energia no material. Essa radiação pode ser reflectida, transmitida, dispersa ou absorvida pelo meio irradiado através de quatro processos distintos: Efeito Fotoeléctrico, Dispersão de Compton, Produção de Pares ou Dispersão de Rayleigh. No entanto, neste último processo, os fotões do feixe incidente interagem com o átomo como um todo e acabam por ser dispersos com o mesmo comprimento de onda sem que provoquem qualquer tipo de excitação e/ou ionização à molécula, sendo considerado, por isso, uma dispersão coerente[36].

A predominância destes fenómenos está directamente relacionada com a energia do fotão incidente, com o número atómico e, consequentemente, com a densidade do material, como é possível observar na figura 3.2.

De forma a quantificar essa probabilidade de interacção, recorrendo ao coeficiente

linear de atenuação μ que representa a combinação das probabilidades individuais de cada um dos mecanismos, para um determinado comprimento de onda, surge a equação 3.2

$$N = N_0 e^{-\mu x} \quad (\text{Equação 3.2}) [37]$$

Onde N é o número de fótons transmitidos, N_0 o número de fótons incidentes e x a espessura do material. Como a densidade do material é um factor determinante no que toca à interacção da radiação com a matéria, é mais adequado o uso do coeficiente de atenuação mássico $\left(\frac{\mu}{\rho}\right)$ que transforma a equação 3.2 na equação 3.3

$$N = N_0 e^{-\frac{\mu}{\rho}(\rho x)} \quad (\text{Equação 3.3}) [36]$$

Onde ρ representa a densidade do material em g/cm²[36].

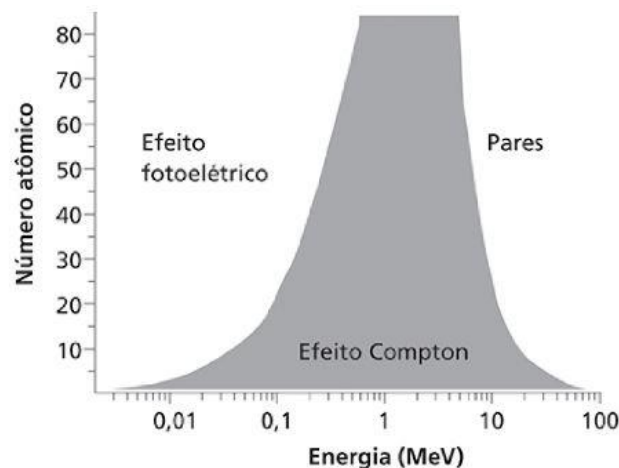


Figura 3.2 – Predominância do fenómeno de interacção da radiação com a matéria com a energia e o número atómico[34].

3.2.1. Dispersão de Rayleigh

A Dispersão de Rayleigh é mais provável para energias baixas de poucos keV e para materiais de número atómico elevado pelo que não é representado no gráfico da figura 3.2. Ele consiste na interacção dos fótons com o átomo como um todo não existindo transferência de energia para o material, uma vez que ela é absorvida e libertada de seguida por meio de fótons com a mesma energia e comprimento de onda. No entanto, apesar de não haver ionização do átomo, o feixe de fótons pode ver a sua trajectória alterada[34][38][39].

3.2.2. Efeito Fotoeléctrico

O efeito Fotoeléctrico baseia-se na interacção entre o fóton incidente e um electrão. Depois da colisão o fóton desaparece por completo e é ejectado no seu lugar um fotoelectrão que deixa para trás uma lacuna. Dá-se a produção de um ião excitado que pode regressar ao estado fundamental através de um electrão de uma camada mais externa que preenche aquela lacuna originando fenómeno de fluorescência, i.e. a emissão de um ou mais fótons com energia igual à diferença entre as energias das orbitais em causa[36].

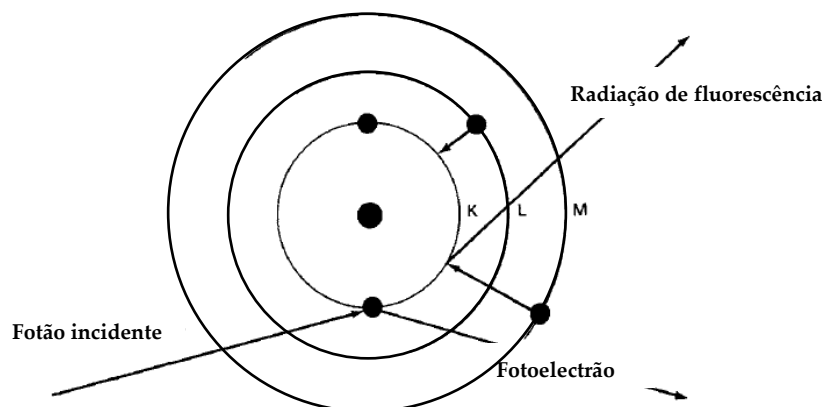


Figura 3.4 – Esquematização das interacções durante o efeito fotoeléctrico. Adaptado de [36]

Dependendo do tipo de radiação e, consequentemente, da sua energia, o electrão que é atingido inicialmente pode ser de uma orbital mais interna ou mais externa, ou seja, estar fortemente ou fracamente ligado. A energia das radiações visível e UV apenas permite que interajam com electrões mais externos, ao passo que os raios X e γ tem energia suficiente para atingir os electrões mais internos. Concluindo, para que o efeito ocorra é necessário que a energia do fóton incidente seja igual ou superior à energia de ligação[34], [36].

3.2.3. Dispersão de Compton

A Dispersão de Compton é o mecanismo de interacção mais recorrente em tecido biológico. Baseia-se na colisão entre o fóton incidente e um electrão livre ou pouco atraído pelo núcleo regida pelas leis da conservação de energia e momento linear. Desta forma, a energia é dividida pelo electrão de Compton resultante e por um fóton disperso que forma um determinado ângulo com a direcção inicial de propagação[36].

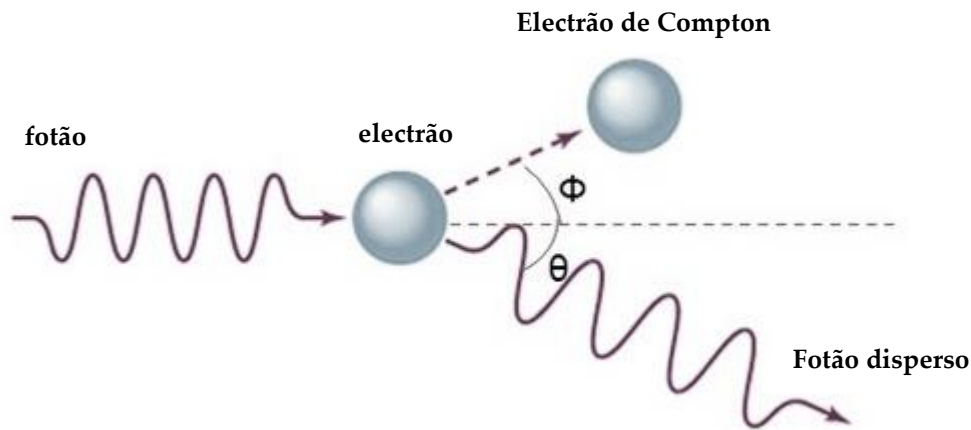


Figura 3.5 – Representação esquemática das interações durante a dispersão de Compton. (Adaptado de[40])

3.2.4. Produção de Pares

Finalmente, pode ainda ocorrer o fenómeno de produção de pares, ou seja, a produção de um electrão e a sua antipartícula, um positrão. Para que isso aconteça, o fóton incidente com energia superior a 1,022 MeV, que passa perto do núcleo do átomo, é sujeito aos fortes efeitos do campo electromagnético e é absorvido reaparecendo na forma do par supramencionado que adquiriu toda a energia inicial composto por duas partículas de igual massa mas carga oposta[36][34][41][38]. O positrão originado, ao encontrar-se posteriormente com uma partícula de carga oposta, aniquila-se formando dois fótons que se propagam em direcções opostas, sendo um processo bastante utilizado em Medicina Nuclear[38].

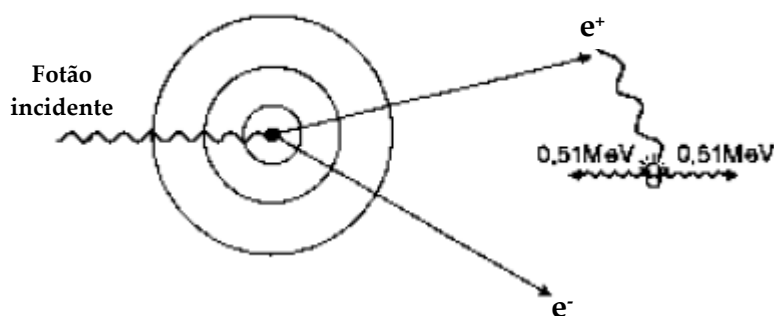


Figura 3.6 – Representação esquemática das interações durante a produção de pares. (adaptado de [42])

Concluindo, os efeitos provocados são dependentes da energia da radiação que se faz incidir num determinado material. Na maioria dos casos, o material pode apenas elevar a sua temperatura devido ao aumento da actividade vibracional das moléculas, mas para

radiações ionizantes com energias mais elevadas os efeitos prejudiciais são iminentes. Efeitos biológicos à parte, o facto de as interacções serem distintas permite a utilização desses princípios físicos na recolha de informação sobre os materiais e as suas características.

No que toca à técnica de radiografia, em que é utilizada a radiação com energia na gama dos raios X como feixe incidente, predominam apenas três dos processos de interacção descritos: Dispersão de Rayleigh, Dispersão de Compton e Efeito Fotoeléctrico, devendo estes ser considerados como princípio físico base da técnica analítica descrita mais adiante no capítulo 5.3.

4. Estado da Arte

Desde sempre procurou-se desenvolver técnicas que auxiliem o médico dentista no diagnóstico de lesões no tecido dentário. Nessa base, foram realizados diversos estudos onde foram alcançados resultados que promoveram o avanço tecnológico nesta matéria.

Em meados do ano 2006, Pretty fez um levantamento das técnicas recentemente mais utilizadas no diagnóstico de lesões de cárie apresentadas na tabela 4.1. Entre elas, técnicas visuais, radiográficas e ópticas com princípios base de raios x, luz visível, luz laser, corrente eléctrica e ultrassons, onde os sistemas baseados em auto-fluorescência se revelaram mais promissores[9].

Tabela 4.1 – Métodos de detecção de cárie tendo por base os seus princípios físicos[9].

Radiação/Partículas incidente	Aplicação na detecção de cárie
Raios-X	Radiografia Digital de subtracção Melhoramento digital de imagem
Luz visível	Iluminação transmitida por fibra óptica Fluorescência quantitativa induzida por luz visível Imagem digital de iluminação transmitida por fibra óptica Medida de fluorescência induzida por laser (DiagnoDent)
Corrente eléctrica	Medição da condutância eléctrica Medição da impedância eléctrica
Ultrassons	Detector ultrassónico de cáries

Quatro anos mais tarde, Karlsson também realizou uma revisão sistemática sobre esses métodos baseados em propriedades ópticas dos tecidos. Realçou três técnicas capazes de uma avaliação quantitativa e semiquantitativa de lesões, a fluorescência induzida por luz branca, fluorescência induzida por laser e iluminação transmitida por infravermelho próximo[43].

Em 1999, Armengol, *et al.*, realizaram um estudo *in vitro* com o objectivo de tratar cáries, dentina e esmalte por métodos convencionais e com recurso ao laser Er:YAG. Com 30 dentes cariados, divididos pelas duas técnicas, obtiveram resultados da análise das amostras através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV) que revelaram satisfatório o uso do laser supramencionado uma vez que não causou qualquer alteração, derretimento ou fissuras[44].

Atsu, *et al.*, examinaram, em 2005, variações na espessura do esmalte dentário e a sua relação com a idade (30-69 anos) da amostra. As amostras foram submetidas à técnica de MEV de forma a se fazerem considerações e medidas de várias estruturas constituintes do tecido dentário. Através de uma regressão linear, calcularam a relação entre os dois parâmetros permitindo fazer recomendações em termos de implicações clínicas na restauração com folhas de porcelana laminada[45].

Em 2014, Uzunov *et al.*, levaram a cabo um estudo visando provar a eficácia de uma ferramenta de diagnóstico de cáries. Para tal, submeteram dentes com lesões profundas na dentina à radiação ultravioleta do aparelho para observar a fluorescência emitida pelos tecidos e também a um método de corante revelador. Para os dois procedimentos verificou-se que as margens da zona cariada coincidiram, tornando assim evidente a eficiência, repetibilidade e rapidez dos resultados no que toca à utilização deste dispositivo na prática clínica[46].

Zakian *et al.*, com o objectivo de detectar lesões iniciais de cárie, basearam a investigação nas alterações térmicas provocadas pela desidratação. Com recurso a radiação de infravermelho provocaram respostas termodinâmicas em 72 locais porosos de 25 dentes com diferentes graus de desmineralização. A imagem térmica obtida mostrou-se fiel na discriminação de lesões no esmalte superficiais e profundas[47].

Parte da mesma equipa de investigação, no ano anterior, tinha provado que a imagem espectral na zona do infravermelho podia ser usada para quantificar e mapear lesões superficiais. Foi avaliado o comportamento espectral da absorção da água e o efeito da porosidade na dispersão da luz em 12 dentes dotados de vários graus de lesão. Apesar de não fornecer as coordenadas exactas da localização da cárie, providencia uma ajuda preciosa na tomada de decisões por parte dos profissionais de dentística[48].

No entanto, a espectroscopia Raman tem se revelado cada vez mais uma técnica poderosa neste campo da Medicina Dentária, onde já foram realizados diversos estudos com resultados bastante promissores. De acordo com a revisão sistemática realizada por Rodrigues e Galzerani em 2012, através desta técnica é possível compreender fenómenos que, anteriormente, só eram estudados teoricamente, destacando-a por ser rápida, versátil e não-destrutiva[49].

Schulze, *et al.*, objectivaram a sua investigação para a caracterização das junções dentárias em comparação com os tecidos calcificados adjacentes. Para tal, utilizaram a técnica mencionada anteriormente, onde, através de espectros e mapeamentos 3D, constataram que as zonas de transição, entre esmalte e a dentina e entre a dentina e o cimento, eram caracterizadas por uma transição química e não por fases separadas, uma vez que não foram detetados picos de um composto químico único, mas sim de uma eventual mistura de vários[50].

Wulfman, Sadoun e Chapelle conduziram uma investigação tendo por base o uso da espectroscopia Raman como método alternativo e não destrutivo no estudo da transformação da zircónia (material muito utilizado em restaurações dentárias). Foi possível medir as alterações internas e, graças à observação microscópica, desenhar mapas 3D de todos os parâmetros estruturais envolvidos[51].

Silveira, *et al.*, utilizaram pela primeira vez, em 2012, a microscopia Raman confocal para identificar a presença de oxigénio na superfície do esmalte após a aplicação de um produto branqueador. Este estudo *in vitro* obteve resultados notáveis passíveis de influenciar novas perspectivas na matéria do branqueamento. Já está estabelecido que o oxigénio é um inibidor dos adesivos dentários e da polimerização de resinas compostas, pelo que a utilização desta técnica para a detecção deste elemento se torna extremamente útil no que toca à caracterização de tecidos dentários e à performance dos materiais utilizados nas restaurações clínicas[52].

Castro *et al.*, combinaram a técnica de espectroscopia μ -Raman com espectroscopia μ -EDXRF (Micro Fluorescência de raios X dispersiva em energia) para avaliar se o grau de desmineralização e o conteúdo elementar no esmalte sofrem alterações em caso de uso excessivo de branqueamento. Para tal, 12 dentes saudáveis foram submetidos durante 39 dias (excedendo as recomendações do fabricante) a dois procedimentos com dois géis de branqueamento distintos obtidos sem prescrição pela internet. Os espectros obtidos comprovaram que o uso excessivo destes químicos provoca perda mineral da superfície do esmalte uma vez que se constataram alterações significativas no perfil do pico de fosfato[53].

Até ao ano de 1996, alguns investigadores tentaram reduzir o efeito da fluorescência nos seus estudos através da remoção do composto orgânico (colagénio) das suas amostras. Na tentativa de contornar esse problema deixando a amostra intacta, Wieliczka, Spencer e Kruger utilizaram, nesse ano, a espectroscopia μ -Raman combinada com um laser Kr^+ , para caracterizar a interface adesivo-dentina. Através dessa técnica, construíram mapeamentos da camada híbrida onde é possível constatar a variação da constituição química da mesma, comprovando, assim, a utilidade desta espectroscopia

para o estudo desta interface[54]. Estes resultados foram suportados por Miyazaki, Onose e Moore, em 2002 [55] e por Parthasarathy *et al.* em 2008 [56].

No entanto, em 2006, Wang, Spencer e Walker constaram que essa interface entre adesivo e dentina era mais complexa e irregular quando se tratava de dentina afectada do que com dentina sã. Ao compararem a composição química da interface do adesivo com ambos os tipos de dentina com recurso à microscopia Raman, concluíram que as diferenças entre os espectros obtidos em ambos os casos não podiam ser explicadas apenas com base na diminuição da desmineralização, mas tinha de se ter também em conta que a estrutura de mineral e de colagénio da dentina afectada era modificada durante o desenvolvimento da cárie[26].

De entre o leque variado de utilizações que a espectroscopia Raman revela ter nesta área científica, existe um tema específico onde esta tem sido uma ferramenta essencial e bastante promissora, mais concretamente, a cárie dentária. Desta forma, o estudos nesta base já são variadíssimos e, a maioria deles, são prova de grande avanço, tanto teórico como clínico.

Ribeiro *et al.*, em 2001, utilizaram a espectroscopia Raman no infravermelho próximo para diagnóstico em tecidos dentários. As medições de 70 amostras revelaram características particulares nos espectros de tecidos cariados em comparação com os sãos principalmente a nível da banda principal de fosfato a 960 cm^{-1} [57].

Ko *et al.*, combinaram Tomografia de Coerência Óptica (TCO) com espectroscopia Raman visando a detecção e caracterização de lesões iniciais de cárie. Os resultados obtidos por TCO revelaram um aumento de fluorescência nas amostras cariadas relativamente às sãs e foram suportados pelos resultados obtidos na segunda técnica em que se constatarem mudanças no pico de fosfato maioritariamente atribuídas ao facto do processo de desmineralização provocar alterações na conformação da estrutura cristalina[58]. Sowa *et al.*, reafirmaram estas conclusões frisando a precisão, repetibilidade e reproductibilidade das medidas realizadas promovendo o seu valor a nível de prática clínica[4].

No ano seguinte, grande parte daquela equipa de investigação, submeteu amostras providas de lesões do tipo *white spot* e de áreas de desmineralização ainda com superfície intacta à espectroscopia Raman polarizada. Os resultados são, assim, dependentes da orientação do campo eléctrico da radiação a que a amostra é sujeita (perpendicular ou paralela) e, neste caso, constatarem-se resultados semelhantes aos do estudo anterior. Em adição, através do cálculo da razão de despolarização, o esmalte saudável mostrou

ter um elevado grau de anisotropia³ comparativamente ao esmalte cariado, com baixo grau. Mais especificamente, é no pico de fosfato PO_4^{3-} a 960 cm^{-1} que se constata a dependência, o que torna possível discriminar tecido saudável de são[5]. Em 2009, à semelhança do estudo anterior, Ionita, utilizou o cálculo da RD, ou seja, a razão matemática entre o integral do pico fosfato obtido com polarização perpendicular e o integral obtido com polarização paralela, como forma de contornar o fenómeno de fluorescência provocado pelo material orgânico originário da actividade bacteriana e a baixa intensidade dos picos de fosfato provocada pela desorganização estrutural dos tecidos lesados[59].

Já em 2008, uma equipa novamente liderada por Ko, com o objectivo de simplificar e agilizar o processo de análise descrito no estudo precedente, desenvolveu um sistema constituído por um espectrómetro acoplado com uma fibra óptica que lhes possibilitou recolher dados das duas polarizações em simultâneo. Ao desenvolverem este sistema, aumentaram a viabilidade e probabilidade de ele ser implementado em estudos *in vivo* e até, no futuro, na prática clínica[60].

Bulatov *et al.*, em 2008, adicionou a este tipo de investigação o método de mapeamento. As amostras dotadas de vários tipos de lesão no esmalte foram submetidas à espectroscopia de Raman e os resultados revelaram que as características espectrais e morfológicas obtidas por mapeamentos são diferentes entre esmalte são, zonas brancas opacas, zonas acastanhadas e zonas cavitadas realçando os diferentes estágios de progressão da lesão[61].

Mais recentemente, em 2012, Salehi *et al.*, conduziu uma investigação que aliou a utilização de uma câmara LED chamada SoproLife e a espectroscopia Raman. O primeiro dispositivo permitia identificar mudanças na autofluorescência (emissão cujo comprimento de onda depende da densidade e composição química do material) de certas zonas com lesão em relação às regiões sãs da mesma amostra. Posteriormente, a segunda técnica foi utilizada como meio de comprovação tendo-se revelado com sucesso. O estudo realizado em duas amostras *ex vivo* e duas amostras *in vivo* obteve resultados relativamente satisfatórios[62].

Almahdy *et al.*, no mesmo ano, procederam ao estudo da dentina sã, dentina afectada e infectada no processo de lesão de cárie. O objectivo seria correlacionar as suas características microespectroscópicas com a sua dureza e autofluorescência. Os dados obtidos por μ -Raman concluíram que esta técnica tem bastante potencial no que toca à discriminação entre os dois tipos de dentina e, por conseguinte, na definição do melhor método de escavação aquando do preparo cavitário diminuindo o risco de remoção

³ Característica do material em que uma certa propriedade física varia com a direcção.

excessiva de tecido[63].

Finalmente, em 2015, Coello *et al.*, projectaram um método de diagnóstico quantitativo directo através de espectroscopia Raman. O objectivo era detectar mudanças moleculares específicas nos tecidos mineralizados e estabelecer um padrão de normalidade. Após a aquisição dos espectros, foram propostos dois índices de mineralização em que a parte mineral (fosfato a 430 cm^{-1} e 960 cm^{-1}) foi correlacionada com a parte orgânica (ligações C-H a 2941 cm^{-1}). Foi então estabelecido um padrão de normalidade e, para comprovar o sucesso desta metodologia, a equipa aplicou-a a dois casos de estudo onde as lesões presentes não podiam ser detectadas por métodos de diagnóstico tradicionais, como por exemplo a radiografia, e os resultados foram satisfatórios[64].

5. Técnicas Analíticas

5.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica não destrutiva muito útil no estudo da composição e estrutura de uma amostra através da identificação dos seus modos vibracionais[55][65].

Esta modalidade de espectroscopia tem por base o efeito de Raman que foi descrito por Sir C.V. Raman em 1928. Em 1930, o seu trabalho foi reconhecido com a atribuição do Prémio Nobel e, em sua honra, a técnica recebeu o seu nome[65][66].

5.2.2. Efeito de Raman

O princípio físico que rege este tipo de espectroscopia baseia-se na irradiação do material constituinte da amostra com recurso a um laser de radiação monocromática[51]. Quando se faz incidir o laser na amostra, parte da radiação pode ser reflectida, transmitida, absorvida ou dispersa pelo material. Da parcela da radiação dispersa, dois fenómenos podem ocorrer: dispersão elástica de Rayleigh, que ocorre à frequência do laser incidente, e/ou dispersão inelástica de Raman, que corresponde a frequências distintas da radiação incidente uma vez que o fotão é afectado pela amostra e é dispersado com outro comprimento de onda[49][67][68].

Ambos os efeitos têm por base a dispersão da luz e transição da molécula para um “estado virtual” de energia em que o fotão incidente é momentaneamente absorvido e outro é criado e disperso por uma transição a partir desse estado virtual.

A dispersão de Rayleigh é a mais provável de acontecer, uma vez que o fotão não perde energia, e a dispersão de Raman a menos provável, dado que o fotão disperso resulta da transição entre o estado virtual e o 1º estado excitado vibracional, adquirindo valores de energia e frequência diferentes dos iniciais[67].

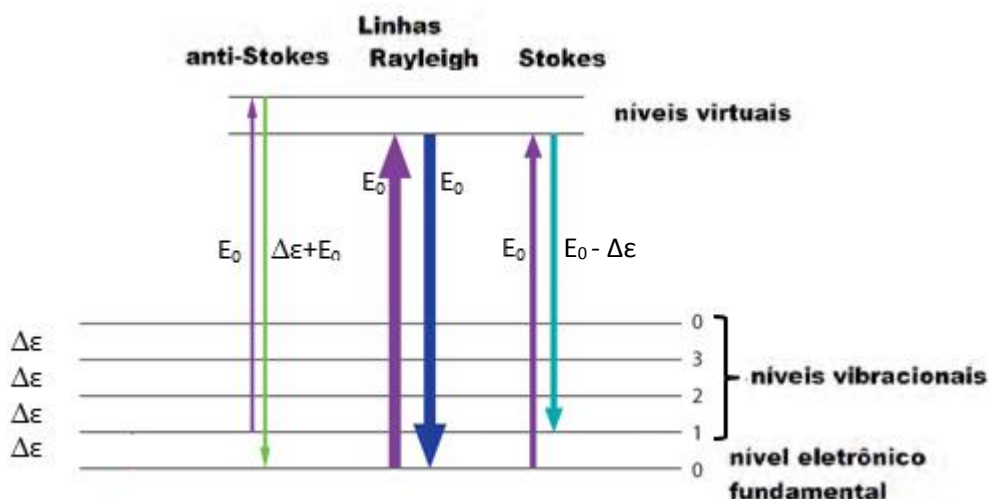


Figura 5.1 – Representação esquemática das transições possíveis para uma molécula (adaptado de [68], [69]).

Os processos desta dispersão de Raman, representados na figura 5.1, podem ser classificados de duas formas: se a frequência da radiação dispersa for menor que a frequência da radiação incidente, ou seja, se a molécula estava inicialmente no estado vibracional fundamental e, após a interação, o sistema perde energia, atribui-se a designação *Stokes*. Por outro lado, se a molécula estava inicialmente num estado vibracional excitado e a frequência de dispersão é maior que a incidente, o sistema adquire energia e o fenómeno intitula-se de *anti-Stokes* [49][67].

Para simplificar e descrever classicamente essa dispersão, considere-se uma molécula composta por partículas carregadas como um sistema oscilatório sujeito a um campo eléctrico externo. Quando a molécula, dotada de uma certa polarizabilidade (α), interage com um campo eléctrico (E), dá origem a um momento dipolar induzido (μ):

$$\mu = \alpha E \quad (\text{Equação 5.1}) [65][67]$$

Com,

$$E = E_0 \cos(\omega_0 t) \quad (\text{Equação 5.2}) [65]$$

Essa polarizabilidade está directamente relacionada com as alterações nas posições de equilíbrio que um determinado campo eléctrico externo consegue provocar na molécula e, considerando que a sua nuvem electrónica se tenta adaptar em função dos seus movimentos nucleares para minimizar a energia do sistema e atingir o equilíbrio, conclui-se que existe uma dependência entre a polarização e as coordenadas nucleares (q), pelo que se tem:

$$\alpha = \alpha(q) \quad (\text{Equação 5.3}) [65]$$

Com,

$$q = q_0 \cos(w_0 t) \quad (\text{Equação 5.4})[65]$$

Fazendo a compilação das equações 5.2, 5.3 e 5.4 em 5.1 obtém-se a fórmula que melhor caracteriza a dispersão de Raman:

$$\mu(t) = a_0 E_0 \cos(w_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q_0 E_0 \cos[(w_0 - w_q)t] + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q_0 E_0 \cos[(w_0 + w_q)t] \quad (\text{Equação 5.5})[65]$$

Em que w_0 e w_q representam, respectivamente, as frequências de oscilação do campo eléctrico e do modo normal de vibração molecular.

Nesta equação podem identificar-se as três formas de dispersão nas três parcelas que a constituem, de Rayleigh, de Raman Stokes e de Raman anti-Stokes, respectivamente.

A observação e consequente intensidade deste efeito está, então, dependente do estado vibracional da molécula em estudo e, consequentemente, da mudança na sua polarização. Esta última é crucial uma vez que, só na sua presença, existe dispersão de Raman[67][70].

Este tipo de espectroscopia permite, então, medir as energias dos modos normais de vibração que são representadas por bandas bem definidas no espectro (figura 5.2)[51][49].

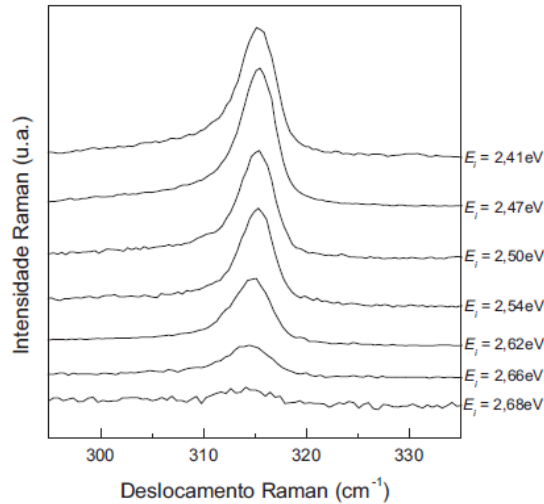


Figura 5.2 – Exemplos de espectros de Raman de uma mesma amostra excitada com várias energias. No eixo das abcissas está representada a diferença entre o número de onda das radiações incidente e dispersa em cm^{-1} e no eixo das ordenadas a intensidade espectral em unidades arbitrárias[49].

Essas bandas espectrais representam o *gap* energético entre o estado fundamental e o estado vibracional, dado pela diferença entre a energia do fóton incidente e o fóton disperso ($\Delta\epsilon$) dependendo se, depois da interacção com a radiação, a energia do sistema aumentou ou diminuiu[68], [71].

Tendo em conta que a aquisição é feita a moléculas e não a elementos simples, podem-se estimar as fracções que compõem uma mistura. O espectro vibracional de Raman pode, então, ser considerado como a impressão digital do material, uma vez que nenhum outro material apresentará um igual[51], [55].

5.2.3. Microscópio Raman Confocal

O principal efeito prejudicial para a espectroscopia Raman é a fluorescência. A fluorescência é a interacção ressonante da luz com os estados electrónicos da amostra e a sua eficiência pode ser cerca de 6 ordens de grandeza superior à interacção de Raman[72]. Quando este problema persiste, configurar uma detecção confocal será a melhor alternativa. Para tal, é utilizado um microscópio óptico com várias ampliações (10x, 50x ou 100x) que foca o laser através da objectiva num ponto específico da superfície do material, como é possível constatar pela figura 5.3. A luz que é dispersa é, assim, colectada pela mesma objectiva e submetida a um filtro notch que permite separar os fótons com comprimento de onda alterado da radiação de Rayleigh. De seguida, a radiação passa pelo orifício confocal do microscópio que determina o volume de amostra que é analisado e, por fim, é colectada pelo detector CCD (Charge-Coupled Device)[51], [68].

Apesar de, nem sempre o sinal de Raman ser muito intenso, o fenómeno de fluorescência é quase inexistente, o que torna esta técnica uma alternativa mais viável e com melhor resolução espacial da superfície da amostra. Para que os resultados sejam o mais satisfatórios possível, a sua utilização requer o máximo de equilíbrio entre esses dois aspectos.

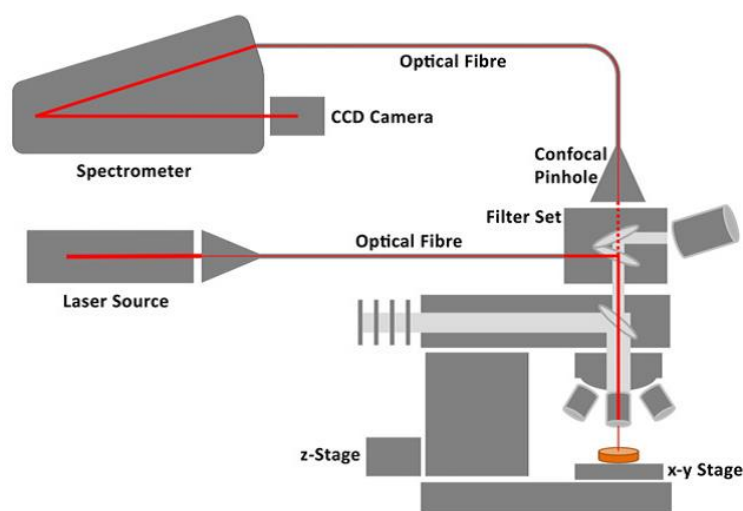


Figura 5.3 – Imagem representativa dos principais componentes de um aparelho de microscopia Raman confocal[73].

5.2.4. Vantagens e Desvantagens da técnica

O que torna esta técnica específica de espectroscopia tão aliciante são as variadas vantagens que detém, entre elas o facto de requerer muito pouca ou nenhuma preparação e de ser não destrutiva, ou seja, as amostras permanecem intactas depois da análise, permitindo o estudo contínuo tanto a nível espacial como temporal[70].

É ainda de ressaltar a óptima resolução espacial, a simplicidade e a reproductibilidade dos resultados obtidos[74], [75].

Por fim, a técnica é muito vantajosa para estudo de material biológico e não está limitada a amostras transparentes por se basear em dispersão e não em absorvância[70], [75].

Em contrapartida, esta técnica requer um equipamento bastante dispendioso, pode apresentar fenómenos de fluorescência que provocam ruído de fundo e também pode revelar-se demorada uma vez que mapeamentos de áreas muito extensas podem levar dezenas de minutos ou até mesmo horas[65].

5.3. Radiografia Digital

A radiografia consiste na formação de uma imagem bidimensional que tem por base o princípio físico da interacção da radiação X com os tecidos biológicos por meio de processos previamente descritos no capítulo 3. Os raios X são, então, radiações electromagnéticas ionizantes bastante energéticas compostas por fotões[38].

Esta técnica em formato digital subentende um sistema (subfigura 5.4 b)) constituído basicamente por uma fonte de radiação X (âmpola em vácuo), um filtro que retém as baixas energias, um colimador, um detector e um *software* para processamento e armazenamento das imagens.

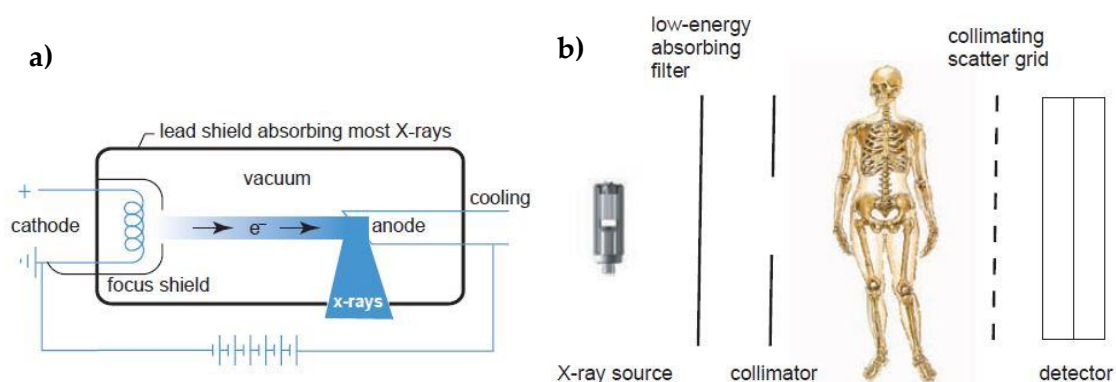


Figura 5.4 – Imagem representativa dos principais componentes de um aparelho de radiografia a) ampola de raios X e b) componentes intervenientes na técnica[38].

Para a produção desta radiação, a ampola de raios X (subfigura 5.4 a)) torna-se um dos componentes mais importantes. Ela é responsável pela aceleração de um feixe de electrões originários no cátodo que colidem posteriormente com um alvo, o ânodo. Ao ser aplicada uma tensão entre esses dois pólos (usualmente entre 50 e 150 kV), os electrões são acelerados e, quando colidem com o material do alvo (normalmente feito de molibdénio ou tungsténio), podem penetrá-lo parcialmente de forma que perdem alguma da sua energia que é, então, convertida em emissão de raios X [39][38].

No interior do tubo, os raios X podem ser produzidos por dois mecanismos distintos: *Bremsstrahlung* ou Radiação característica. No primeiro caso, quando um electrão passa perto do núcleo do átomo, ele é desacelerado por ser atraído pelo campo electromagnético sendo depois defletido e perdendo parte da sua energia que é convertida na emissão de raios X. Quanto ao segundo caso, existe a colisão do electrão com um electrão fortemente ligado do alvo provocando a sua ejeção e formando uma lacuna que é, posteriormente, preenchida por um electrão de uma camada mais externa emitindo um raio X característico[39].

Depois de atravessar a região de interesse, o feixe de raios X é atenuado de acordo com a espessura, a densidade e os números atómicos[34]. Essa atenuação diferenciada traduz-se na quantidade de radiação que é recolhida pelo detector que constitui o chamado contraste do objecto que será depois transferido para a imagem. A radiação X pode não interagir com os tecidos, pode ser dispersa mudando de direcção ou completamente absorvida no tecido e não atingir o detector, tornando, então, a imagem obtida num mapa da intensidade da parte transmitida da radiação.

Estas interacções podem ser descritas por três dos fenómenos explicados no capítulo 3: Dispersão de Rayleigh, Dispersão de Compton e Efeito fotoeléctrico, considerando como feixe incidente os raios X em particular.

O tipo de interacção da radiação X com o material irradiado está directamente relacionado com a radiação que atinge o detector na medida em que os feixes podem sofrer alterações de trajectória e nunca chegar ao destino ou chegarem em intensidade reduzida resultando em níveis de contraste distintos.

Desta forma, consoante a energia da radiação incidente, a densidade do material e as interacções entre eles, a percepção visual dos tecidos na imagem radiográfica varia, como por exemplo os tecidos moles, que são muito pouco densos, não são visíveis nestas imagens ao contrário do que acontece com os ossos que são bastante densos.

6. Materiais e Métodos

De forma a alcançar os objectivos propostos para este estudo, foi necessário reunir materiais e desenvolver metodologias. Grande parte do protocolo experimental foi executado no laboratório de Biomateriais da Unidade de Investigações em Ciências Orais e Biomédicas (UICOB) da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL) e a restante parte, nomeadamente a aquisição dos espectros Raman e registo de imagem, foi conduzida no Laboratório de Física Atómica do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-NOVA).

6.1. Selecção das amostras

Para este trabalho foram seleccionados oito dentes humanos, cinco com lesão de cárie em estágio avançado para o estudo comparativo das técnicas de diagnóstico e três com lesão branca para os estudos A e B. As amostras foram cedidas pelo Banco de Dentes da UICOB e seleccionadas por um médico dentista através de avaliação visual e táctil. Parte delas estão presentes na fotografia da figura 6.1. Após a sua selecção, foram conservadas numa solução aquosa de cloramina a 0,4%, de acordo com a norma ISO/TS 11405/2003.



Figura 6.1 – Fotografia de três das oito amostras seleccionadas.

6.2. Preparação dos espécimes

6.2.1. Corte

Para obter uma base auxiliar de corte rígida, os dentes foram fixados, individualmente, com cola quente a um cilindro de acrílico. De seguida, a porção oclusal (coroa) foi separada da porção radicular (raiz) com recurso a uma serra diamantada incorporada numa máquina de corte (IsoMet1000 Precision Saw, Buehler Ltd, Illinois, EUA), sob refrigeração.

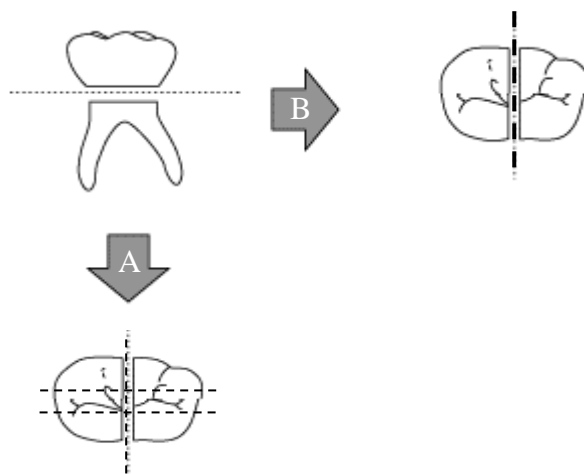


Figura 6.2 – Esquema de corte das amostras para ambos os estudos A e B (adaptada de [76]).

6.2.1.1. Corte dos espécimes para o estudo A

A coroa dentária foi assente num molde paralelepipedico⁴ através de cera de fixação e posteriormente embebida em resina acrílica (Tetric EvoFlow®, composição em Apêndice I). Por fim, a coroa foi novamente seccionada, desta vez perpendicularmente ao eixo do dente, obtendo-se fatias com cerca de 2,5 mm de espessura. Os espécimes foram numerados de A1 a A8.

6.2.1.2. Corte dos espécimes para o estudo B

A resina infiltrante (Optibond FL®, composição em Apêndice I) foi aplicada sobre a lesão branca em metade da sua superfície, de seguida a coroa foi embebida em resina de

⁴ Desenhado e impresso em impressora 3D no laboratório de fabricação FCT FabLab.

acrílico e, finalmente, seccionada em duas partes nesse mesmo eixo de divisão. Os espécimes, representados na figura 6.3, foram numerados de B1 a B3.



Figura 6.3 – Fotografia dos espécimes B1 a B3 depois do procedimento infiltrante.

6.2.2. Protocolo de aplicação da resina infiltrante

Com base num produto revolucionário já existente no mercado, o Icon® (DMG, Hamburgo, Alemanha), projectou-se um protocolo semelhante composto pelos mesmos compostos mas com recurso a uma resina muito menos dispendiosa Optibond® FL (Kerr, Scafati, Itália) (composição em Apêndice I).

Para a aplicação do produto infiltrante, a superfície da lesão foi preconditionada com ácido clorídrico a 15% durante 2 minutos para remover a água presente nas porosidades da lesão permitindo a impregnação da resina hidrofóbica por forças capilares. De seguida, lavou-se o ácido durante 30 segundos, secou-se com ar e aplicou-se etanol absoluto, deixando actuar durante 30 segundos. Por fim, aplicou-se a resina infiltrante hidrofóbica removendo o excesso com uma zaragatoa, deixou-se actuar por 3 minutos e fotopolimerizou-se durante 40 segundos.

6.2.3. Preparação dos Espécimes para Análise Espectroscópica (μ -Raman) e registo de imagem

Antes da análise com espectroscopia Raman, cada espécime foi submetido a uma sequência de polimento com lixas de SiC de granulometria 1200 (Buehler, referência 30-5218-012, Struers, Copenhaga, Dinamarca) e 2500 (Buehler, referência 30-5218-025, Struers, Copenhaga, Dinamarca), seguido do polimento em pano de feltro com suspensão de diamante monocristalina de granulometria 1 μ m (MetaDi, Buehler, Copenhaga, Dinamarca), intercalados com banho de 1 minuto em ultrassons. Por fim, os

espécimes foram limpos com etanol utilizando uma zaragatoa de forma a eliminar quaisquer resíduos que ainda pudessem permanecer na sua superfície.

Após efetuadas as medições, os espécimes foram acondicionados em água destilada.

6.3. Registo de imagem

Visando a comparação das características ópticas e visuais das estruturas dentárias e lesões de cárie entre cada tipo de radiação, as amostras foram submetidas a registos de imagem com diferentes dispositivos.

6.3.1. Microscópio Digital DinoLite

As imagens foram adquiridas com recurso a um Microscópio Digital portátil (AM4013-FVW DinoLite Pro USB) com capacidade de ampliação até 215x, resolução de 1.3 Megapíxel e composto por luz LED branca visível e luz LED ultravioleta de 365 nm, montado num suporte universal através de uma garra e uma noz. Para cada espécime foram guardadas várias imagens em duas ampliações (51.9x e 209.1x) da lesão e estruturas dentárias.

6.3.2. Lupa Binocular

Foram também adquiridas imagens com recurso a uma Lupa Binocular (Leica M205 C, Leica Microsystems) com ampliação de 7,8x até 160x. Para cada espécime foram guardadas várias imagens em diferentes ampliações da lesão e estruturas dentárias.

6.3.3. Radiografia Digital

Relativamente ao registo radiográfico, fui utilizado um sistema de radiografia digital intraoral (Sirona 4681263 D3302, Sirona Dental Systems, Benshelm, Alemanha) em que o tubo emissor da radiação tinha uma tensão de 60 kV e corrente de 7 mA. A aquisição foi feita com a exposição das amostras aos raios-X por 0,8 segundos e as imagens registadas através do *software* do aparelho.

6.4. Setup Experimental μ -Raman Confocal

Para a análise por micro-espectroscopia Raman, utilizou-se o espectrómetro confocal XploRA (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França) composto por um microscópio (Olympus BX41, Japão) com três objetivas (10x, 50x e 100x) montado no Laboratório de Física Atômica e Molecular do Departamento de Física da FCT-NOVA. As aquisições foram sujeitas a parâmetros específicos do aparelho tais como, fonte de laser diodo com comprimento de onda de 785 nm, filtro de 50% de modo a obter uma potência máxima na amostra de 9 mW, fenda confocal de 300 μ m, slit de 100 μ m e grating de 1200 grooves/mm, obtendo-se uma resolução em energia de 4 cm^{-1} e espacial de, aproximadamente, 1 μ m. A janela de aquisição dos espectros estava centrada em 1300 cm^{-1} correspondente à gama entre os 800 cm^{-1} e os 1800 cm^{-1} , com um tempo de exposição de 15 segundos e 10 acumulações.



Figura 6.4 - Fotografia do espectrómetro μ -Raman Confocal no Laboratório 120, DF/FCT-NOVA.

Após a aquisição, a imagem da zona analisada foi registada com uma câmara fotográfica Ueye 1640 incorporada no microscópio do aparelho e cada espectro foi submetido a um tratamento de correcção de linha de base com auxílio das ferramentas *fitting* e *smoothing* do *software* LabSpec versão 5.58.25 (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França). Para além do ajuste de linha de base, foi ainda calculado, com recurso ao mesmo *software*, o valor do integral (intensidade) da banda de interesse (fosfato, $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, os dados foram trabalhados por meio do *software* Microsoft Excel (2016) e do OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, EUA).

6.5. Razão de Despolarização (RD)

Para todos os mapeamentos e linhas adquiridos, foi calculada a razão de despolarização (RD) através dos espectros que os compõem. Esta RD mede a dependência entre a intensidade da banda de interesse (fosfato a $\sim 960\text{ cm}^{-1}$) e a direcção da polarização da radiação laser a que o substrato está sujeito.

$$\rho_{960} = \frac{I_{960\text{ }(\perp)}}{I_{960\text{ }(\parallel)}} \quad \text{Equação 6.2[4], [5]}$$

Onde $I_{960\text{ }(\perp)}$ e $I_{960\text{ }(\parallel)}$ são os integrais dos picos de fosfato determinados com o analisador orientado perpendicularmente e paralelamente à direcção de polarização da luz laser incidente, respectivamente.

7. Apresentação, Análise e Discussão de Resultados

Neste capítulo encontram-se apresentados os resultados obtidos para ambos os estudos A e B, sendo esses discutidos à medida que são apresentados.

7.2. Estudo A

As figuras 7.1 a 7.3 apresentam as imagens obtidas pelas várias técnicas de diagnóstico por imagem propostas para 3 dos espécimes destinados a este estudo (restantes em Apêndice II).

Em todas as imagens é possível identificar facilmente as várias estruturas que compõem o dente entre elas, o esmalte, a dentina e a cavidade pulpar.

Relativamente à imagem radiográfica [subfiguras a) e b)], essas estruturas (identificadas através de contornos coloridos) distinguem-se por meio da sua radiopacidade, ou seja, a capacidade de atenuar a radiação conforme a composição dos tecidos. O esmalte, por ser um tecido mais denso, é mais radiopaco e, por isso, mais claro na radiografia, ao passo que a dentina, um tecido menos denso composto por mais matéria orgânica, é mais radiolúcida e, então, um pouco menos branca. Ao nível da dentina, esta característica poderá, ainda, ser útil na distinção das duas camadas de uma lesão de cárie, a camada infectada e a camada afectada [a vermelho e verde, respectivamente, na subfigura 7.1 b)], em que a dentina infectada apresenta-se ainda mais clara por se tratar de um material menos denso (colagénio desnaturado e eventual presença de produtos bacterianos). É ainda de fácil observação a perda de estrutura que se estende desde a JAD até à polpa.

Quanto às imagens adquiridas por microscópio digital (MD) com luz visível e UV [subfiguras 7.1 c) e d); subfiguras 7.2 c) e d); subfiguras 7.3 c) e d)] é facilmente observável que a lesão de cárie irradiada com luz UV se aparenta mais extensa do que com luz visível. Na imagem adquirida com iluminação UV também seria espectável um comportamento perante a radiação diferente para cada um dos tecidos, esmalte e

dentina. Esta segunda produz fluorescência, o que seria de esperar uma vez que ela é mais rica em material orgânico.

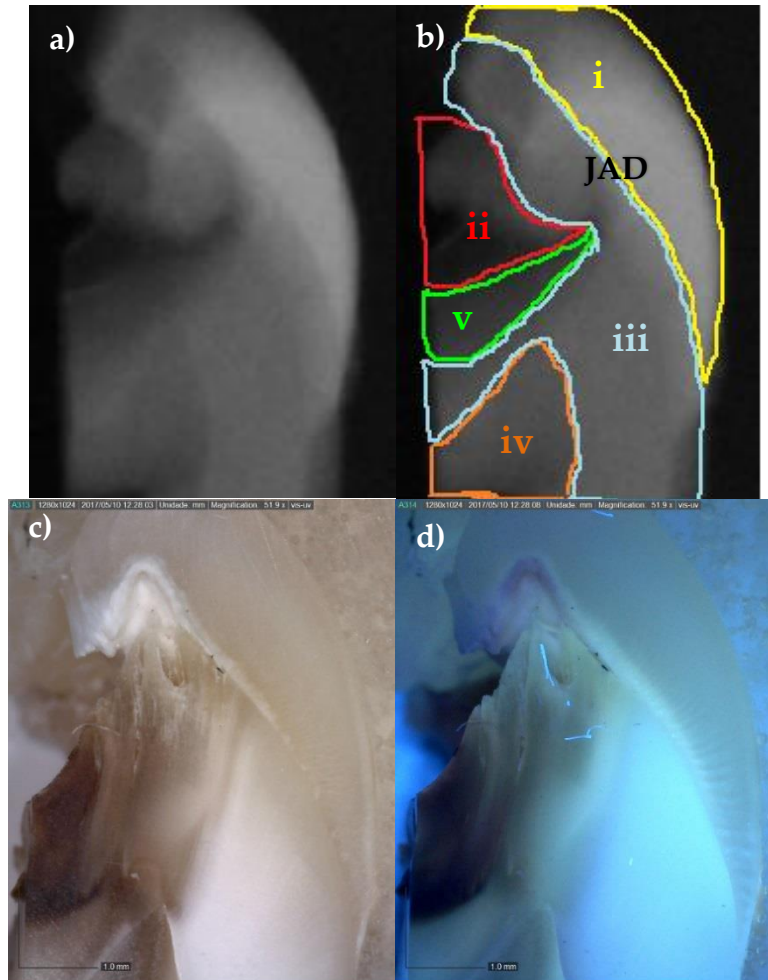


Figura 7.1 – Imagens adquiridas para o espécime A5. a) Radiografia; b) radiografia analisada de forma a indicar as estruturas: i) esmalte; ii) dentina infectada iii) dentina sã iv) cavidade pulpar v) dentina afectada e JAD – junção amelodentinária; c) imagem adquirida por microscópio digital por meio de luz branca e d) imagem adquirida por microscópio digital através de luz UV.

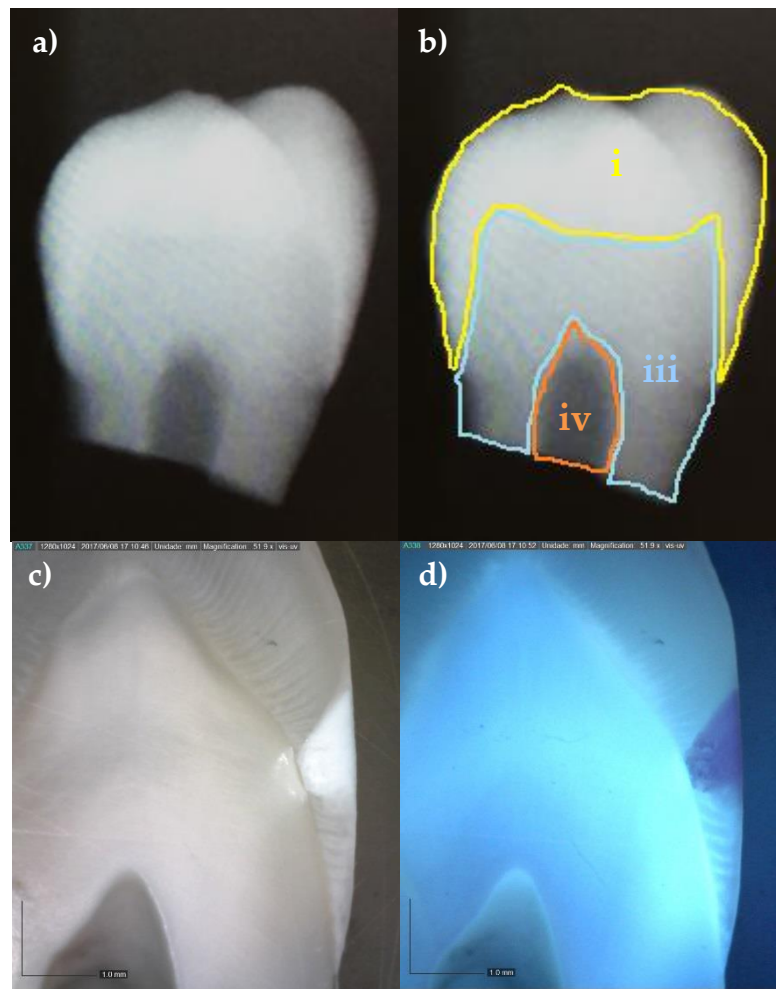


Figura 7.2 – Imagens adquiridas para o espécime A1 com lesão branca. a) Radiografia; b) radiografia analisada de forma a indicar as estruturas: i) esmalte; iii) dentina e iv) cavidade pulpar; c) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação de luz branca e d) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação UV.

Relativamente à figura 7.2, a zona da lesão *white spot* irradiada com luz UV aparenta ser mais escura comparativamente ao esmalte saudável circundante. Resultados semelhantes foram obtidos por Walsh e Shakibaie em 2007 que, após a sua pesquisa, concluíram que esse método é mais eficaz a detectar lesões de cárie iniciais, não cavitadas, do que o método visual e tátil convencional[77]. Nessa figura também é fácil constatar que a imagem radiográfica não apresentou qualquer alteração indicativa da lesão tornando-a imprecisa na detecção deste tipo de lesões iniciais.

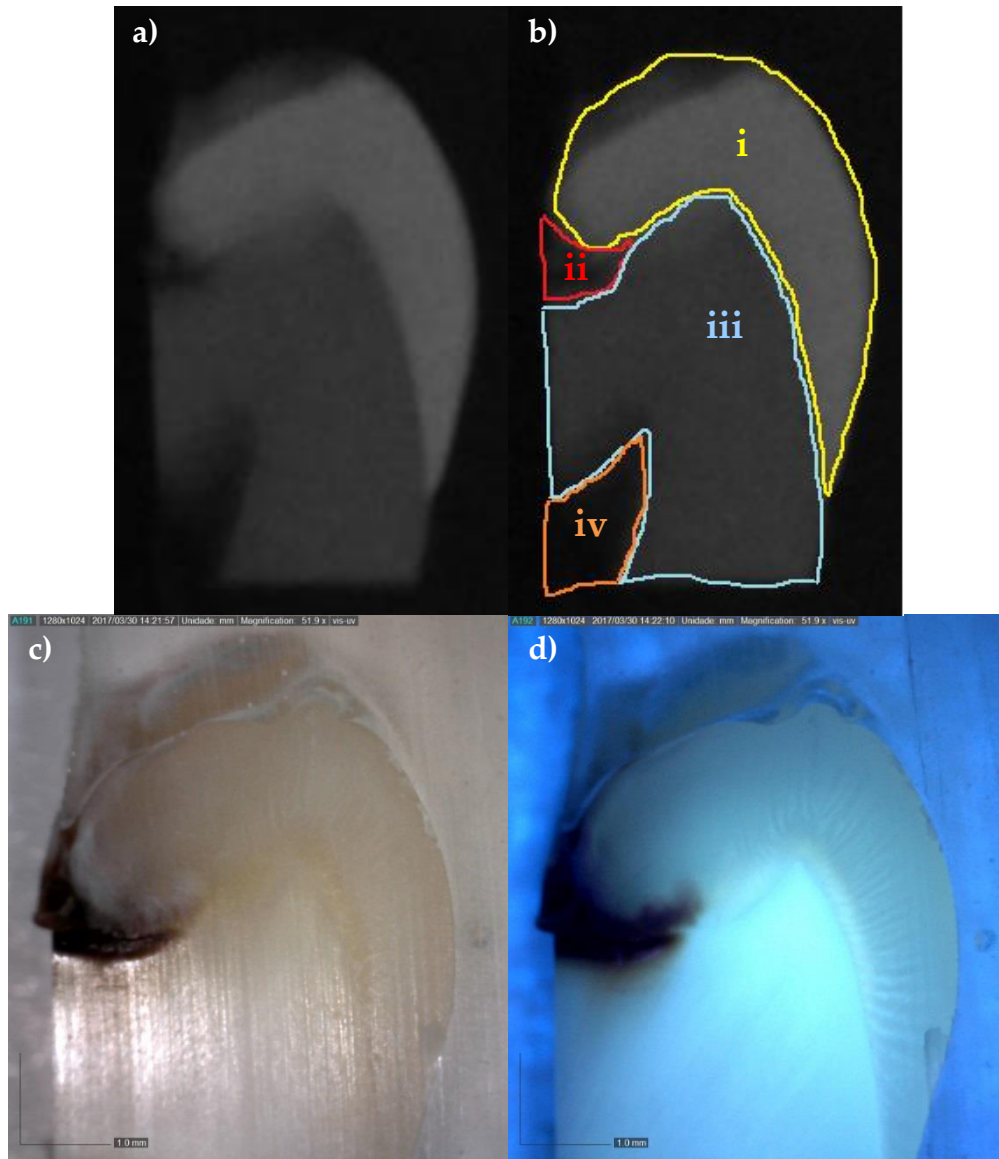


Figura 7.3 – Imagens adquiridas para o espécime A7. a) Radiografia; b) radiografia analisada de forma a indicar as estruturas: i) esmalte; ii) dentina infectada iii) dentina sã e iv) cavidade pulpar; c) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação de luz branca e d) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação UV.

Como referência da fluorescência induzida numa dentina sã pelo comprimento de onda incidente do DinoLite usado, apresenta-se na figura 7.4 a imagem de MD para um espécime hígido, onde se pode observar uma fluorescência azulada/esverdeada[77][78].

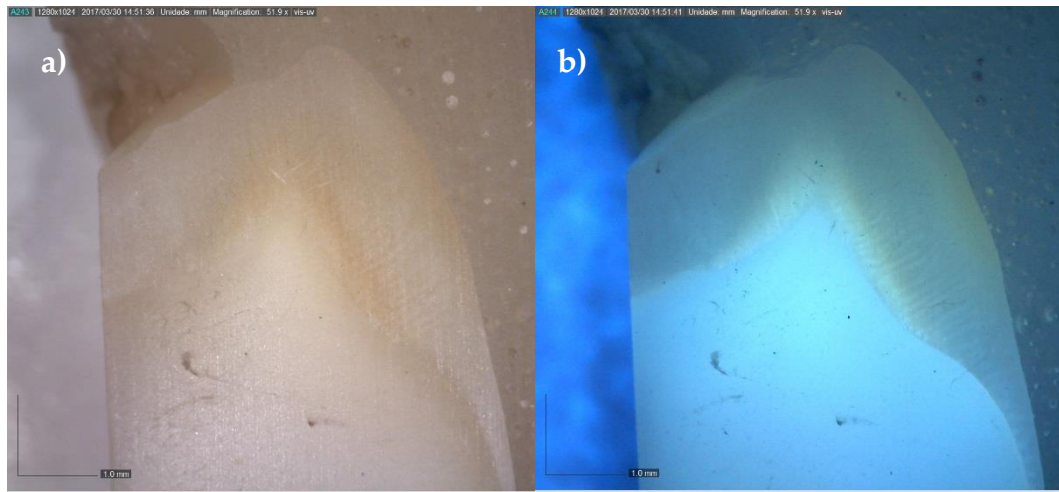


Figura 7.4 – Imagens adquiridas para um espécime hígido. a) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação de luz branca e b) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação UV.

Com recurso a este tipo de radiação também é possível identificar as duas camadas de uma lesão de cárie, infectada e afectada. Neste caso, e como se pode ver nas subfiguras 7.1 d) e 7.3 d), existe uma região onde a radiação UV é toda absorvida pela dentina, sugerindo completa desnaturação do colagénio. No entanto, existe outra região onde apenas se deixa de verificar o fenómeno de fluorescência sugerindo alguma alteração na estrutura do colagénio mas, possivelmente, recuperável. Podem ainda identificar-se nas lesões das amostras A6 e A8 na figura 7.5 *spots* de fluorescência alaranjada que podem estar associados à presença de produtos bacterianos[77]. Contudo, e tendo em conta que o estudo foi realizado *ex vivo*, a identificação de fluorescência associada a actividade bacteriana será pouco provável.

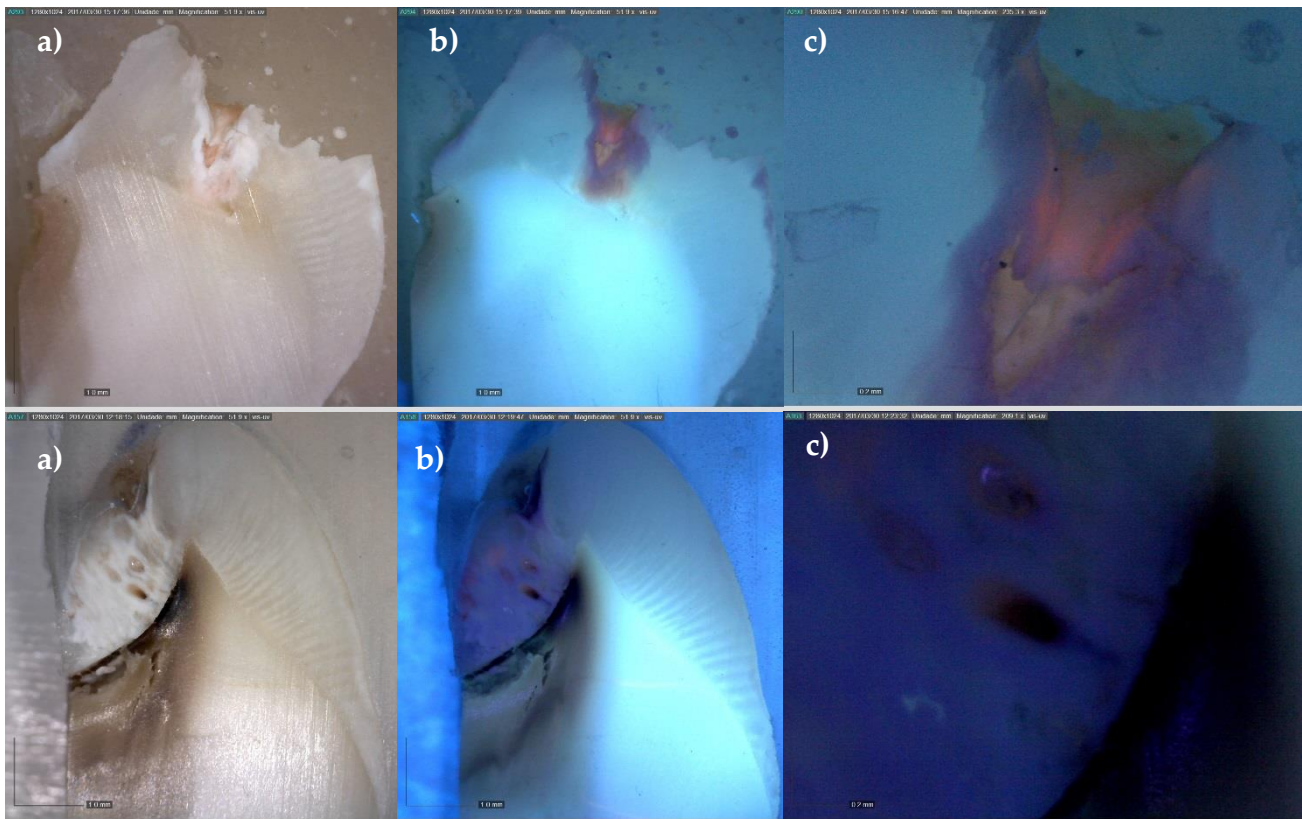


Figura 7.5 – Imagens adquiridas para os espécimes A6 (cima) e A8 (baixo). a) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação de luz branca a 51,9x; b) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação UV ampliação 51,9x e c) imagem adquirida por microscópio digital com iluminação UV ampliação 209,1x.

Comparando a análise por MD com a imagem radiográfica, percebe-se que a zona que aparenta estar cariada é bem menor na radiografia do que aquilo que se consegue ver com iluminação UV e, apesar de se conseguirem identificar diferentes estruturas, é difícil distinguir perfeitamente as fronteiras entre cada uma delas. Considerando que, clinicamente, a radiografia é feita *in vivo* com o dente íntegro, existe uma maior quantidade de substrato que a radiação tem que ultrapassar o que torna, por sua vez, a interpretação mais difícil.

As mesmas conclusões se podem tirar relativamente ao registo de imagem dos restantes espécimes expostos no Apêndice II.

De modo a aferir a correspondência entre as imagens obtidas e a composição química dos tecidos, foi realizada uma análise recorrendo à espectroscopia Raman.

Para determinar a razão de despolarização do modo de alongamento simétrico do ião fosfato ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$), como ferramenta de avaliação da integridade dos cristais de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, adquiriram-se espectros em ambas as polarizações para esmalte saudável [figura 7.6 a)] e para esmalte com lesão de cárie [figura 7.6 b)] num intervalo de deslocamento de Raman de $200\text{ a }2200\text{ cm}^{-1}$ e, à semelhança do que Ionita conclui no seu estudo em 2009, podem observar-se três fenómenos:

- A diminuição de intensidade do pico de PO_4^{3-} a 960 cm^{-1} devido à desorganização estrutural local originada pelo processo de cárie (desmineralização);
- O aumento do fundo provocado pelo fenómeno de fluorescência inerente ao acréscimo de matéria orgânica, nomeadamente a presença de produtos de metabolismo das bactérias durante o desenvolvimento da lesão (observável também em dentina como demonstrado na figura 7.7 e suportado pelos resultados de Mukhin *et al.* em 2006 [79]) e,
- A evidente sensibilidade à polarização por parte da banda de interesse, uma vez que, para tecido saudável, a discrepância entre a intensidade do pico de fosfato entre a polarização paralela e perpendicular é significativamente elevada, ao contrário do que se passa com o tecido lesionado[59].

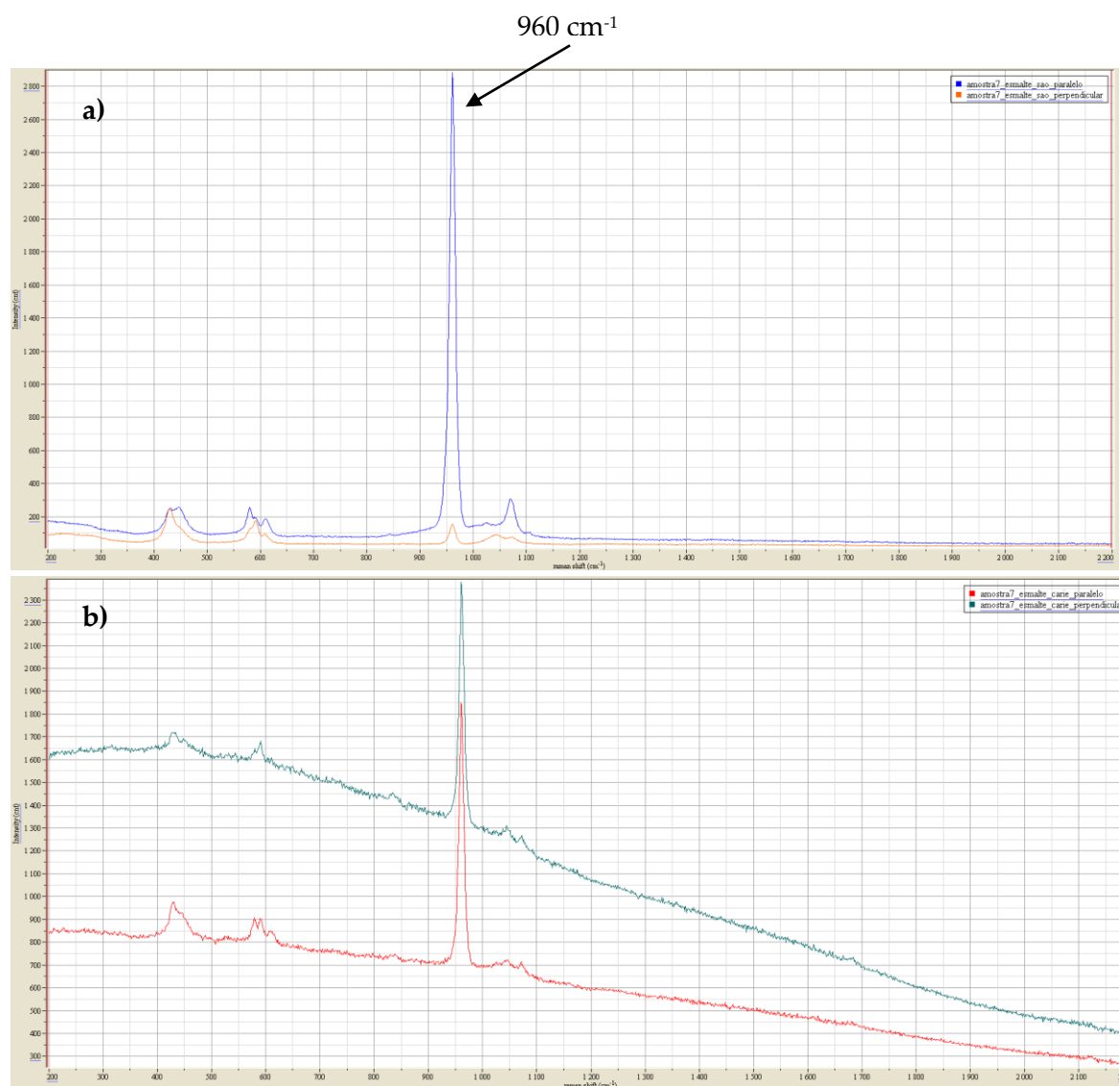


Figura 7.6 – Conjunto de espectros obtidos por espectroscopia Raman para a) esmalte saudável com polarização paralela a azul e polarização perpendicular a laranja; e para b) esmalte cariado com polarização paralela a vermelho e perpendicular a verde. (Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; photo-bleaching 180 s)

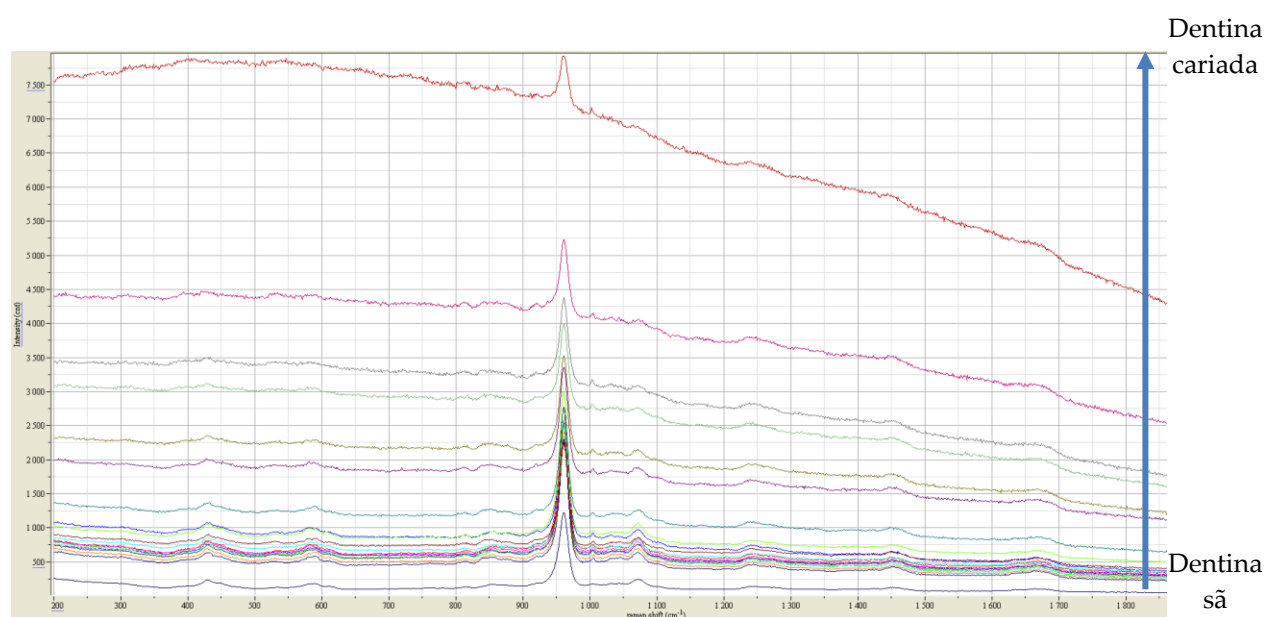


Figura 7.7 – Conjunto de espectros obtidos desde dentina sã até dentina cariada através da espectroscopia Raman (Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; photo-bleaching 180 s; polarização paralela).

As figuras de 7.8 a 7.10 apresentam os mapeamentos realizados em zonas de interesse dos espécimes A5, A6 e A3.

Nas figuras está indicado a tracejado amarelo a zona do espécime onde foi realizado o mapeamento e a tracejado vermelho a zona do mapa onde seria espectável o aumento da RD.

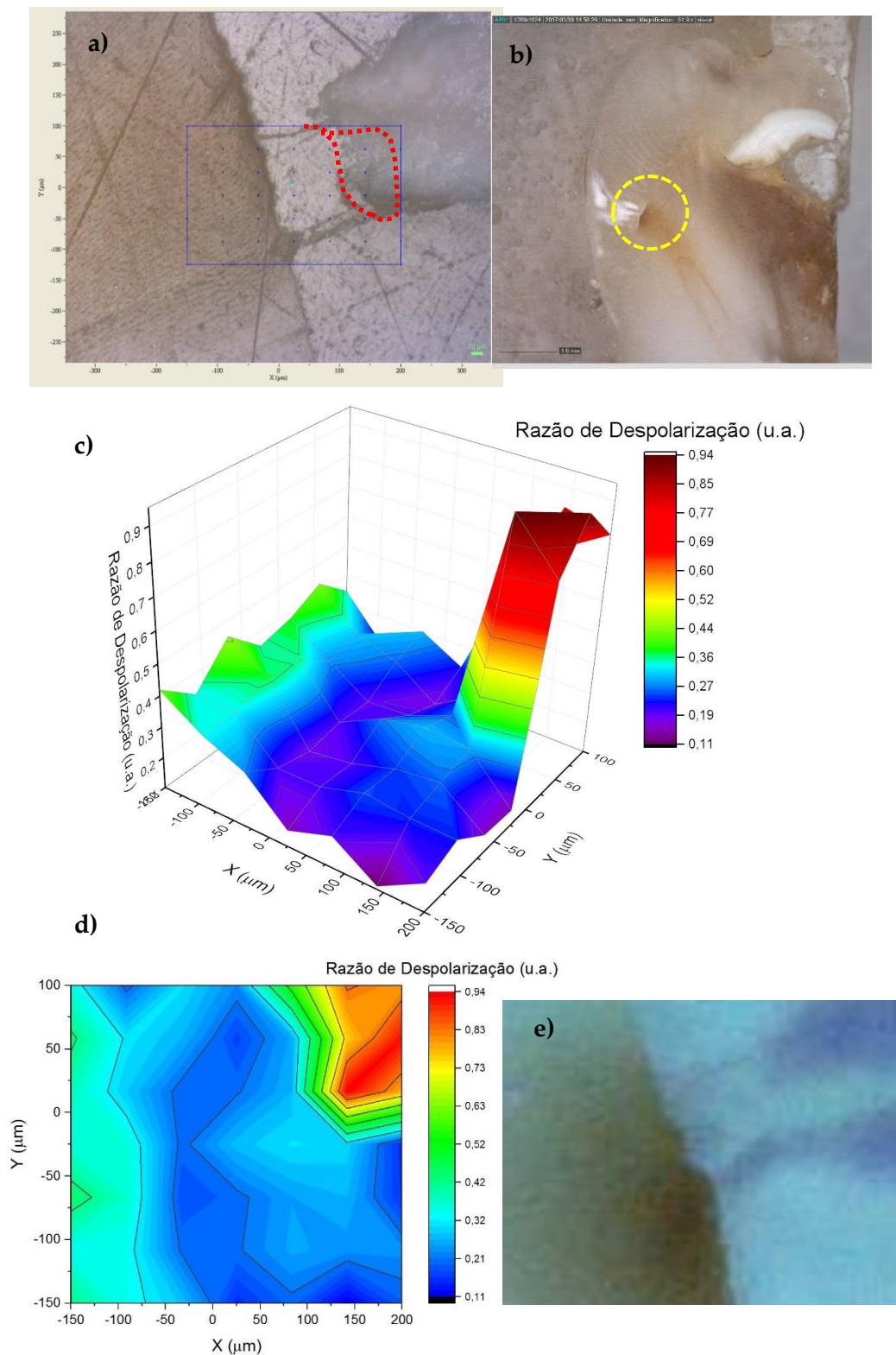


Figura 7.8 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A5 em que a) representa a grelha onde foi realizado um mapa de 7x7 espectros com tracejado vermelho a indicar a zona onde se esperaria um aumento da RD; b) a imagem adquirida por microscópio digital da amostra com a representação a tracejado amarelo da zona onde foi feito o mapa; c) a representação 3D da RD obtida; d) o respectivo mapa de contorno e e) imagem adquirida por MD com iluminação UV da região da lesão ampliada.

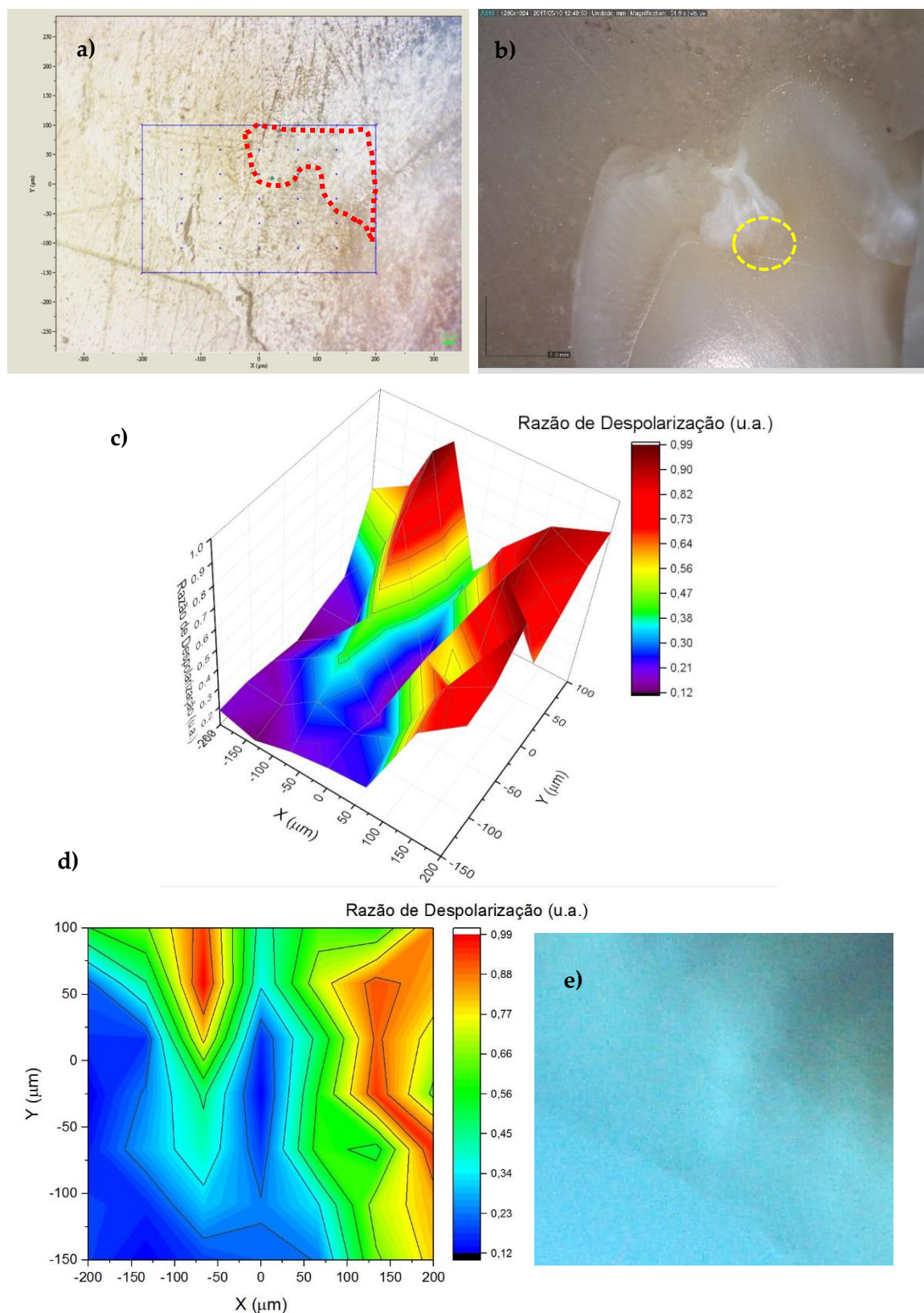


Figura 7.9 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A6 em que a) representa a grelha onde foi realizado um mapa de 7x7 espectros com tracejado vermelho a indicar a zona onde se esperaria um aumento da RD; b) a imagem adquirida por microscópio digital da amostra com a representação a tracejado amarelo da zona onde foi feito o mapa; c) a representação 3D da RD obtida; d) o respectivo mapa de contorno e e) imagem adquirida por MD com iluminação UV da região da lesão ampliada.

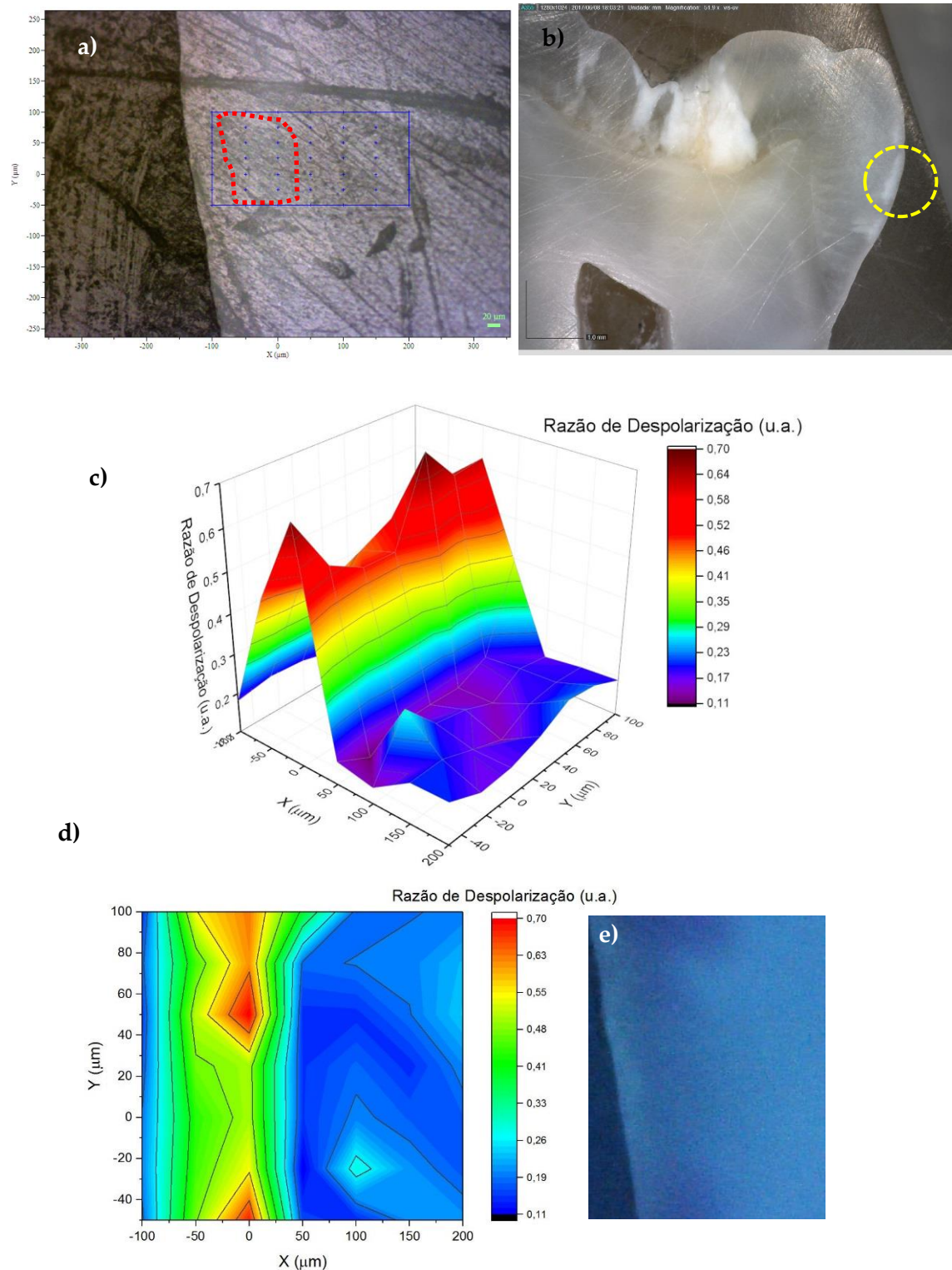


Figura 7.10 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A3 com lesão *white spot* em que a) representa a grelha onde foi realizado um mapa de 7x7 espectros com tracejado vermelho a indicar a zona onde se esperaria um aumento da RD; b) a imagem adquirida por microscópio digital da amostra com a representação a tracejado amarelo da zona onde foi feito o mapa; c) a representação 3D da RD obtida; d) o respectivo mapa de contorno e e) imagem adquirida por MD com iluminação UV da região da lesão ampliada.

Os restantes mapeamentos adquiridos estão expostos para consulta no Apêndice III.

Tendo em conta que se baseiam no cálculo da RD, os resultados obtidos fornecem uma localização espacial da lesão em comparação com os tecidos que lhe são subjacentes e, como seria de esperar, essa razão aumenta quando mais avançado for o estágio de lesão do tecido, teoria que já tinha sido provada em alguns estudos realizados no passado[60][59][4][5].

No entanto, este tipo de análise é bastante demorado (dezenas de minutos ou até horas) pelo que não foi possível proceder a aquisição de mapeamentos com melhor resolução espacial para todos os espécimes e, por isso, foi adoptada a estratégia de recolha de espectros em linha.

As figuras 7.11 a 7.14 contêm a representação gráfica da RD em diferentes tipos de lesão de cárie em esmalte calculada com recurso ao conjunto de espectros obtido para cada linha. As linhas foram adquiridas consoante a direcção representada por meio de uma seta verde posicionada em todas as figuras no local da aquisição. Já os tracejados pretos indicam a porção do gráfico relativa à lesão, sendo que a porção no seu exterior diz respeito aos tecidos sãos.

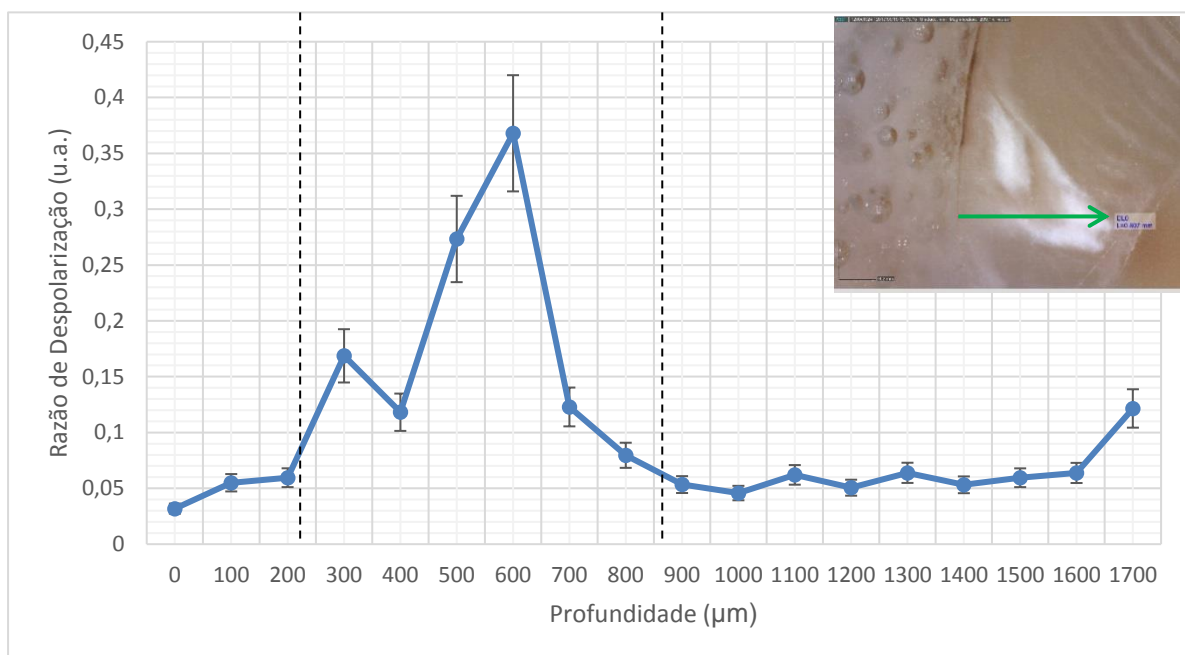


Figura 7.11 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. A região interior dos tracejados negros indica a zona do gráfico relativa à lesão sendo o restante relativo à zona sã. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

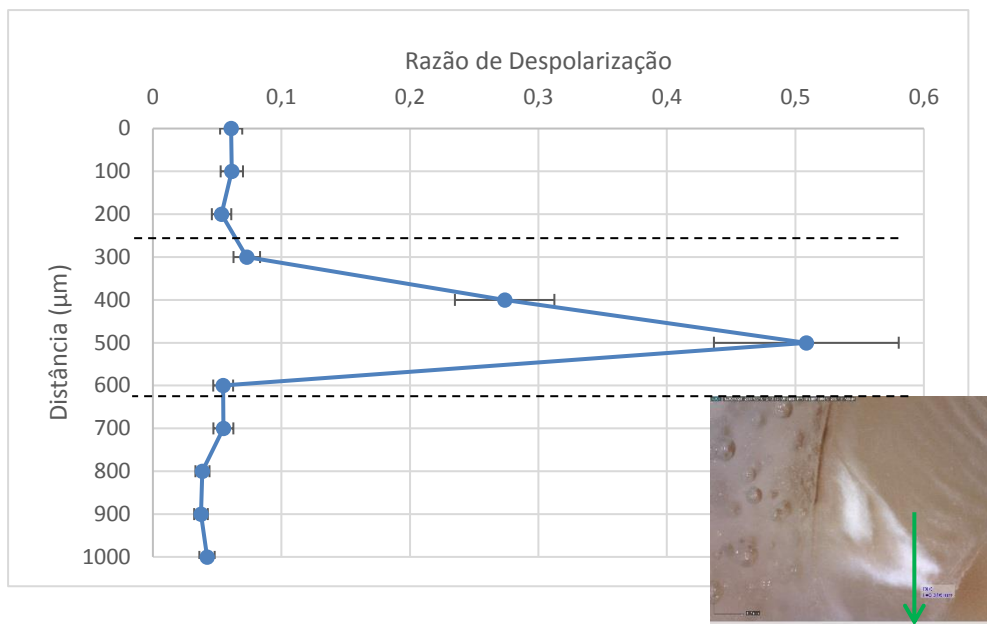


Figura 7.12 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. A região interior dos tracejados negros indica a zona do gráfico relativa à lesão sendo o restante relativo à zona sã. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

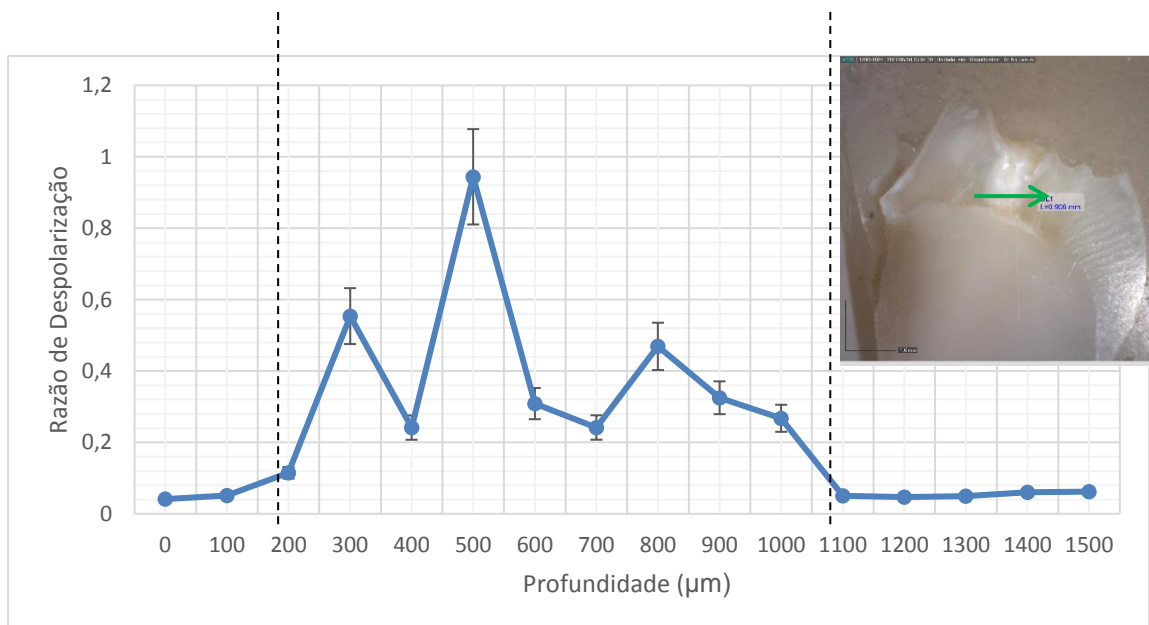


Figura 7.13 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A6 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

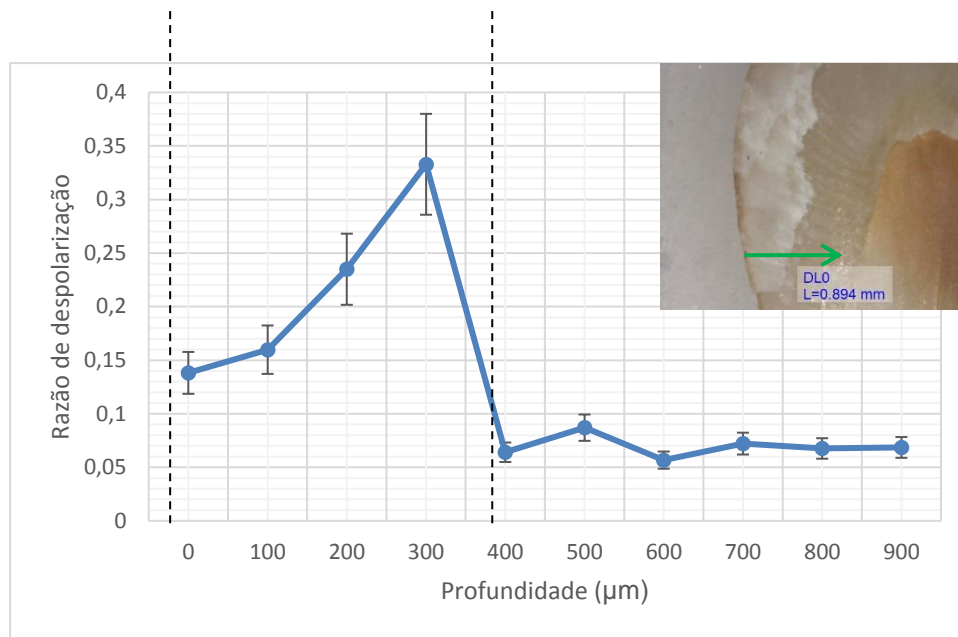


Figura 7.14 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A4 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

Com a análise destes gráficos é possível constatar que o valor da RD aumenta nas zonas mais cariadas à semelhança dos mapeamentos como seria de esperar. No entanto, este acontecimento nem sempre é muito evidente ou acentuado pois é necessário ter em consideração o local onde foi obtido. No caso da figura 7.13, a lesão está parcialmente cavitada no centro pelo que é natural que a zona central do gráfico não apresente um aumento constante da RD tendo em conta que nessas zonas é mais difícil obter-se foco no espectrómetro de Raman. Já no exemplo da figura 7.14, nota-se um crescimento gradual da RD até ao máximo desde a superfície do dente até ao interior o que pode ser explicado pelo facto de que a superfície do dente está em contacto com agentes remineralizadores, nomeadamente a saliva, que podem remineralizar a zona superficial mais rapidamente do que os tecidos imediatamente a baixo provocando essa ligeira remineralização superficial.

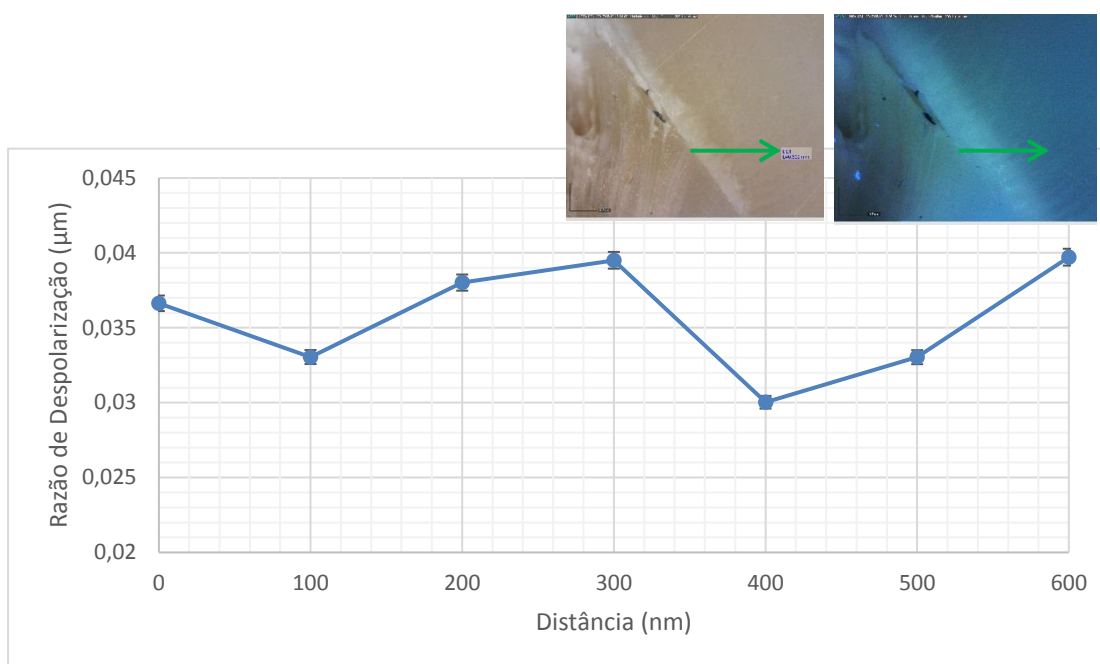


Figura 7.15 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A5 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

Contudo, os resultados obtidos via espectroscopia Raman nem sempre estiveram em concordância com a análise das imagens obtidas por MD, como é o caso da figura 7.15. Inicialmente, na imagem de MD com iluminação UV observava-se uma zona que apresentava mais fluorescência no esmalte junto à JAD comparativamente àquela obtida com iluminação de luz branca, o que podia ser indicativo da existência de alguma desmineralização. No entanto, após a análise Raman, acabou por não se revelarem alterações significativas na medida em que o valor da RD se manteve idêntico em toda a linha adquirida.

As mesmas conclusões se aplicam às restantes linhas adquiridas representadas em forma de gráfico no Apêndice IV.

7.3. Estudo B

Nesta segunda parte da investigação, foi utilizada uma resina hidrofóbica (Optibond® FL) como produto infiltrante, cujo espectro obtido por espectroscopia Raman está representado na figura 7.16.

De forma a determinar a profundidade que o infiltrante atingiu no esmalte através dos espectros de Raman, foi acompanhado o comportamento das bandas mais prevalentes e características do produto, nomeadamente as vibrações de alongamento das ligações C=C no grupo alifático (a 1640 cm^{-1}) e aromático (a 1460 cm^{-1} e a 1610 cm^{-1}).

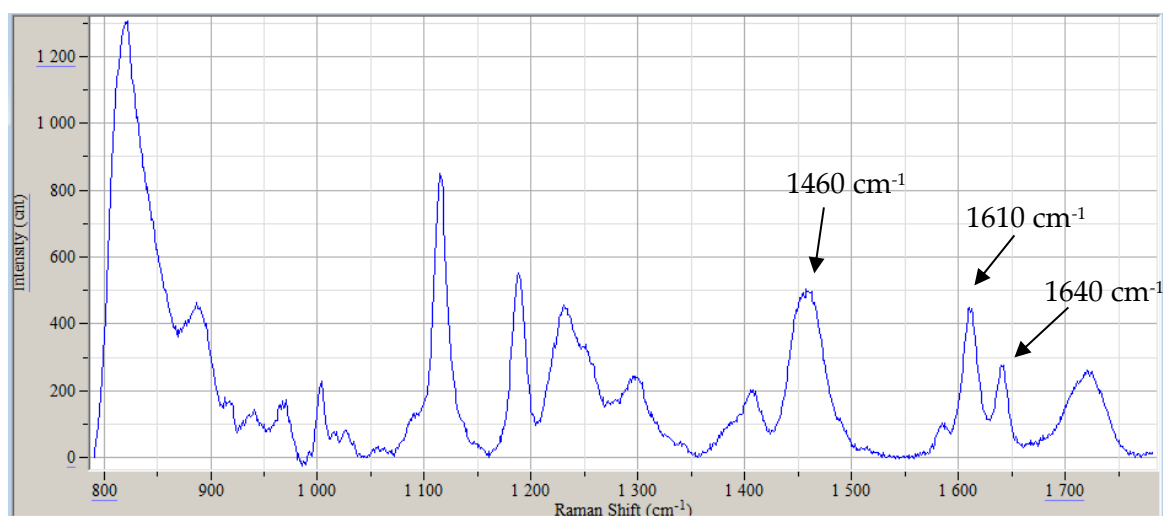


Figura 7.16 – Espectro Raman obtido para a resina infiltrante (Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s).

Dado que existe a integração de uma resina hidrofóbica nos prismas do esmalte, para além dos picos intrínsecos a esse tecido, existem ainda, como era esperado, outras bandas em números de deslocamento de Raman correspondentes ao infiltrante que vão diminuindo até desaparecer, indicando, assim, a profundidade atingida. Desta feita, a profundidade correspondente à obtenção do último espectro em cada conjunto apresentado corresponde ao valor de profundidade procurado.

As figuras de 7.17 a 7.19 dizem respeito à avaliação da profundidade de infiltração do produto em lesões do tipo *white spot* por meio dos espectros adquiridos representados em cascata e acompanhados pela imagem de MD com iluminação de luz branca do espécime em questão. Para melhor percepção, a zona com as bandas de interesse foi devidamente ampliada.

Em média, a infiltração da resina hidrofóbica atingiu uma profundidade de aproximadamente $17\text{ }\mu\text{m}$.

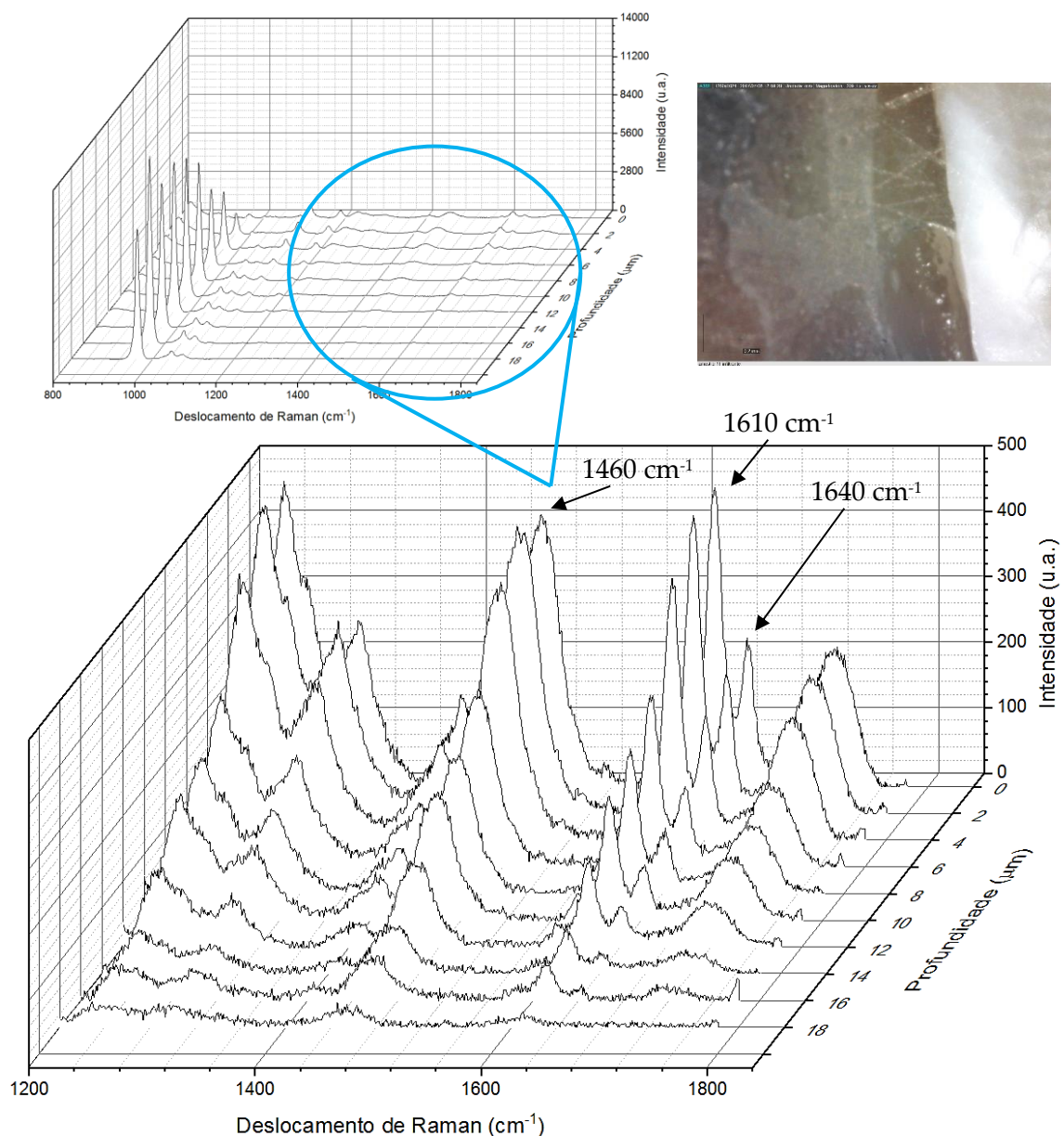


Figura 7.17 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B1, representada em imagem de MD com iluminação de luz branca, espaçados de 2 μm entre si (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

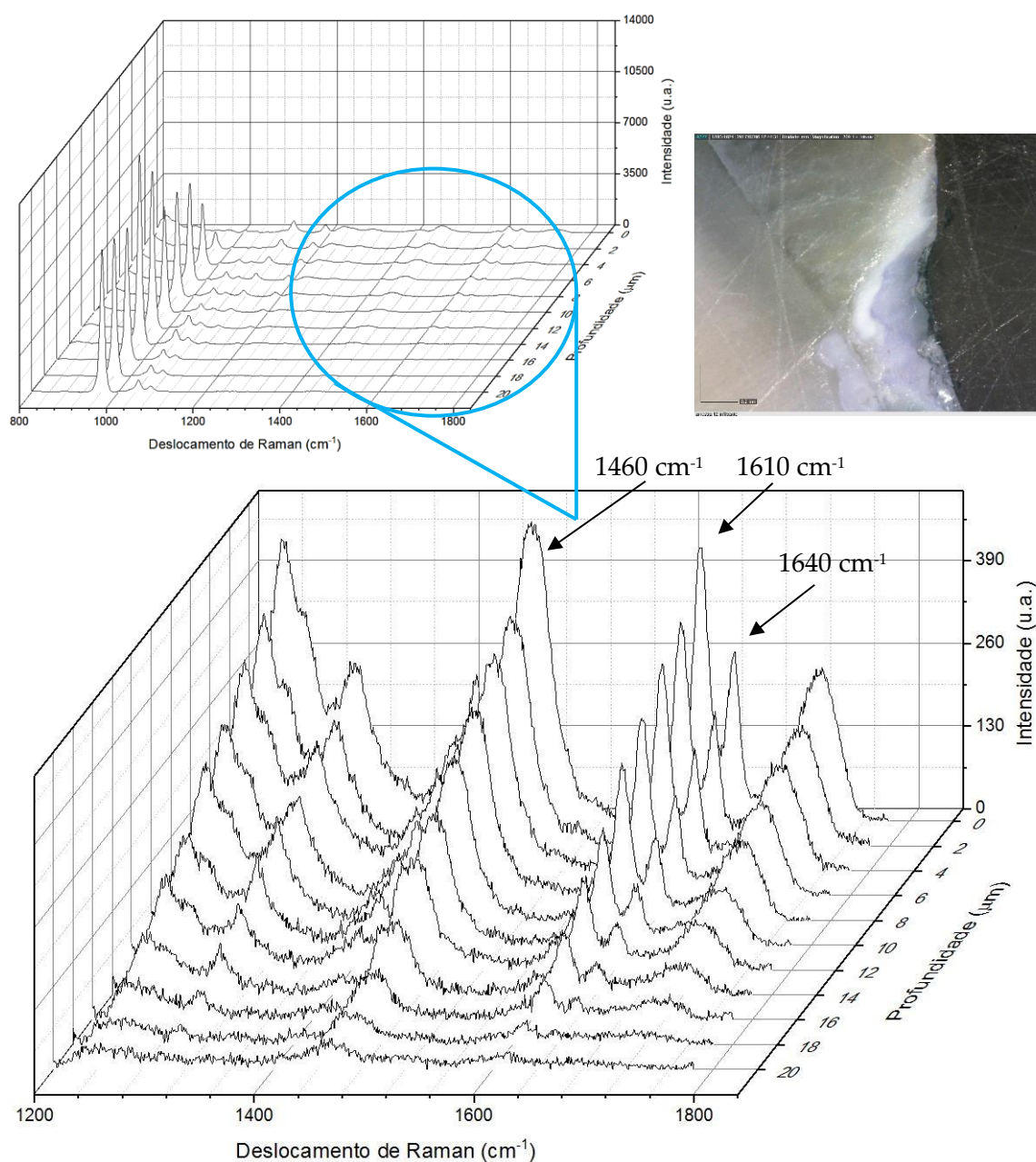


Figura 7.18 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B2, representada em imagem de MD com iluminação de luz branca, espaçados de 2 μm entre si (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

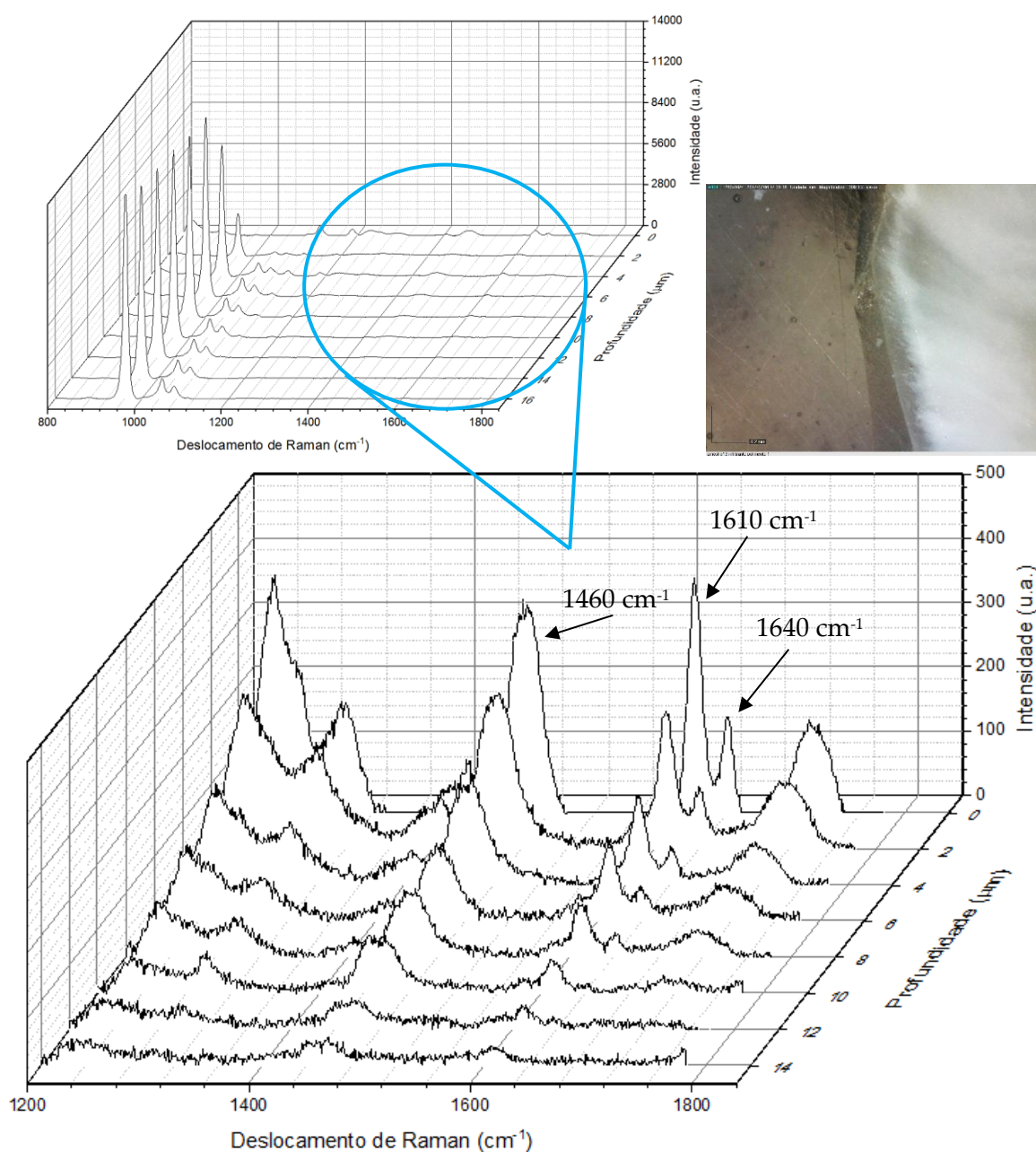


Figura 7.19 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B3, representada em imagem de MD com iluminação de luz branca, espaçados de 2 μm entre si (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

Em todos os casos é possível acompanhar-se a evolução e cessação das bandas de interesse referidas anteriormente, sendo que a profundidade atingida para cada linha foi diferente uma vez que foram estudadas regiões diferentes que podem ser dotadas de composição estrutural diferente entre si e, dessa forma, reagir de forma distinta perante o produto. Essas diferenças podem ser explicadas pelo facto de que, durante o

procedimento infiltrante, os produtos aplicados não tenham sobreposto uniformemente toda a superfície originando assim profundidades de infiltração diferentes para a superfície da mesma lesão ou também devido ao facto da lesão em si não ser estruturalmente uniforme podendo essa ser de um grau mais elevado no centro do que na periferia influenciando, assim, a impregnação dos produtos aplicados.

As profundidades de infiltração para todas as linhas de cada espécime encontram-se listadas na tabela 7.1.

Tabela 7.1 – Profundidade da lesão medida com o *software* DinoCapture 2.0 e profundidade de infiltração para todas as linhas adquiridas para os três espécimes.

Espécime	Profundidade máxima da lesão (μm)	Linha	Profundidade de infiltração (μm)
B1	425	A	6
		B	18
		C	30
		D	10
B2	532	A	20
		B	20
		C	18
		D	26
		E	16
B3	160	A	10
		B	8
		C	26
		D	14
		E	18

As profundidades de infiltração atingidas foram bastante inferiores à extensão máxima da lesão comparativamente com os resultados obtidos em lesões artificiais em 2014 por Gelani *et al.*, onde a impregnação do produto infiltrante Icon® atingiu praticamente a profundidade máxima da lesão[33]. Além disso, e de acordo com Kim *et al.* em 2011, o pré-condicionamento com ácido clorídrico a 15% é eficaz na desmineralização de quase 40 μm de tecido[32] o que facilitaria a impregnação da resina até, no mínimo, essa profundidade, e que não foi atingida. Contudo, é necessário ressaltar que existe a hipótese de o condicionamento não ter condicionado a superfície de forma uniforme à semelhança do que aconteceu no estudo conduzido por Paris *et al.* em 2007[80]. Esse acontecimento pode ser explicado pelo facto dos reagentes utilizados no presente estudo estarem em forma líquida e, por isso, mais difíceis de conter no local

pretendido, em oposição à consistência geliforme dos produtos do *kit* Icon®. Desta feita, a utilização da resina Optibond® FL para efeitos de infiltração em profundidade pode ainda não estar otimizada fornecendo apenas uma protecção superficial indo ao encontro do mencionado por Gelani *et al.* em 2014[33].

Os restantes conjuntos de espectros apresentados no Apêndice V partilham da análise feita anteriormente.

8. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Este trabalho de investigação tinha como objectivo principal a optimização da espectroscopia Raman como ferramenta de diagnóstico em Medicina Dentária aliada a outras técnicas de imagem complementares no que toca à detecção e caracterização de lesões de cárie.

A imagem de fluorescência induzida por UV fornece bastante informação no que respeita à constituição da lesão onde é possível obter-se uma localização e delimitação mais precisa da mesma. Com recurso a este tipo de radiação também é possível discriminar as duas camadas de dentina que constituem uma lesão de cárie e, portanto, a sua integração na clínica da Medicina Dentária seria uma mais valia, evitando o excesso de remoção de tecido no tratamento da cárie, como proposto por Uzunov *et al.* (2014)[46]. Desta forma, revela-se ser uma técnica poderosa mas que apenas disponibiliza informação superficial e, para que possa ser aplicada na clínica, é fundamental a informação em profundidade, estratégia ainda por desenvolver.

Quanto às imagens obtidas por Radiografia Digital, os resultados foram os esperados uma vez que foi mais eficaz na detecção de lesões de estágio significativamente elevado ao contrário de lesões iniciais, revelando-se assim imprecisa na detecção destas últimas.

A determinação da RD por espectroscopia Raman revelou-se também uma ferramenta muito útil na identificação e delimitação das regiões com lesão de cárie. Através da análise dos mapeamentos realizados, pode proceder-se ao diagnóstico de lesões iniciais em esmalte uma vez que, os resultados foram tão satisfatórios para lesões do tipo *white spot* (figura 7.8 e figura A.IV.1) como para outras lesões em estados mais avançados. Contudo, seria interessante realizá-los com maior resolução espacial e perceber o comportamento da RD com mais rigor.

Inicialmente o estudo iria ser feito também em dentina, mas a espectroscopia de Raman não demonstrou a sensibilidade desejada nas bandas relativas ao colagénio ($\sim 1242\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1273\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1453\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ [81][26]) característico desse tecido devido

à ocorrência de fluorescência inerente ao processo de cárie pelo que se incidiu a investigação principalmente em esmalte.

Dado que a aplicação deste tipo de espectroscopia nesta matéria se revelou tão poderosa seria uma mais valia o desenvolvimento de uma sonda intraoral que pudesse ser ligada ao sistema do espectrómetro e permitisse estas medições *in vivo*.

Quanto ao procedimento com resina infiltrante em lesões do tipo *white spot*, os resultados indicam que a profundidade de infiltração foi, em média, cerca de 17 μm , o que parece ser razoável apenas para uma protecção superficial indicando que essa resina ainda não está optimizada para a utilização em procedimentos infiltrantes em profundidade não deixando de ser um bom ponto de partida para determinadas intervenções em clínica.

Durante o decorrer deste trabalho de investigação foram encontradas algumas limitações que podem ser expostas de seguida em forma de sugestão para trabalho futuro:

- Seleccionar amostras por faixas etárias e sexo de forma a ser realizado um estudo estatístico e perceber a sua influência nos resultados obtidos;
- Realizar mapeamentos mais abrangentes e com melhor resolução espacial para uma melhor caracterização das lesões;
- Realizar um estudo de espectroscopia Raman com recurso ao produto Icon® (DMG, Hamburgo, Alemanha) e compará-lo com os resultados deste trabalho de forma a compreender se, de facto, esse produto justifica o seu custo de mercado ou se pode ser substituído por outros mais acessíveis;
- Avaliar o efeito desmineralizador do ácido utilizado no procedimento infiltrante, compará-lo com o a desmineralização intrínseca à lesão de cárie e compreender a sua influência na profundidade de impregnação da resina infiltrante;
- Utilizar outras técnicas de imagem, como por exemplo, MEV, para avaliar o desempenho das resinas infiltrantes a nível estrutural e de aparência em diferentes períodos temporais pós-aplicação.

9. Divulgação

M. Monteiro, A. F. Chasqueira, M. L. Carvalho, S. Pessanha. (2017) “Dental caries diagnosis and early detection using UV induced fluorescence and Raman spectroscopy: comparison with Radiography evaluation”. Poster apresentado em “2nd NOVA Biomedical Engineering Workshop”, FCT – NOVA, Campus da Caparica, 3 Maio 2017. <http://eventos.fct.unl.pt/nbew/>.

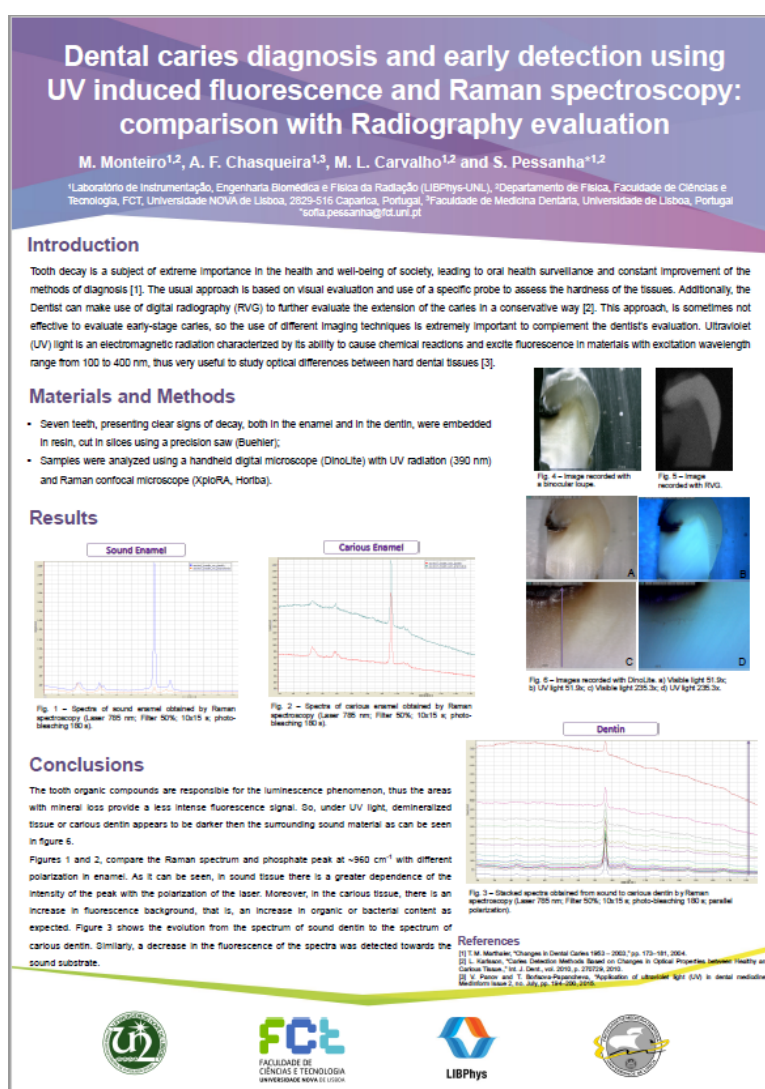


Figura 9.1 – Poster apresentado no 2nd NOVA Biomedical Engineering Workshop.

10. Referências Bibliográficas

- [1] T. M. Marthaler, "Changes in Dental Caries 1953 – 2003," pp. 173–181, 2004.
- [2] H. O. Heymann, E. J. Swift Jr., and A. V. Ritter, *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry*, 6^a. Elsevier B.V., 2012.
- [3] S. E. Bishara and A. W. Ostby, "White Spot Lesions: Formation, Prevention, and Treatment," *Semin. Orthod.*, vol. 14, no. 3, pp. 174–182, 2008.
- [4] M. G. Sowa *et al.*, "Precision of Raman depolarization and optical attenuation measurements of sound tooth enamel," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 5, pp. 1613–1619, 2007.
- [5] A. C. Ko, L. Choo-smith, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong, and B. Cleghorn, "Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy," vol. 14, no. 1, pp. 203–215, 2006.
- [6] A. Vieira, J. R. D. Pereira, L. C. D. S. Beatrice, and C. Heliomar, "Diagnóstico de lesão de cárie proximal por imagem - Revisão Sistemática," vol. 11, no. 1, pp. 17–24, 2012.
- [7] M. Yoshiyama *et al.*, "Bonding ability of adhesive resins to caries-affected and caries-infected dentin," *J Appl Oral Sci*, vol. 12, no. 3, pp. 171–176, 2004.
- [8] S. Pessanha, "Proposta de tese de Mestrado em Engenharia Biomédica: Aplicação da espectroscopia Raman na caracterização do tecido dentário," 2016.
- [9] I. A. Pretty, "Caries detection and diagnosis: Novel technologies," *J. Dent.*, vol. 34, no. 10, pp. 727–739, 2006.
- [10] S. Yang, B. Li, A. Akkus, O. Akkus, and L. Lang, "Wide-field Raman imaging of dental lesions," *Analyst*, vol. 139, no. 12, pp. 3107–14, 2014.
- [11] H. P. S. Menezes, "Anatomia Dentária." [Online]. Available: http://www.hs-menezes.com.br/anatomia_6.html. [Accessed: 31-Jan-2017].
- [12] M. Bath-Balogh and M. J. Fehrenbach, *Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais*, 3rd ed. Elsevier, 2012.

- [13] A. R. Hand and M. E. Frank, *Fundamentals of Oral Histology and Physiology*. Wiley Blackwell, 2014.
- [14] G. S. Kumar, *Orban's Oral Histology & Embryology*, 13th ed. Elsevier, 2011.
- [15] L. P. Gartner and J. L. Hiatt, *Histologia Essencial*. Elsevier, 2012.
- [16] A. Nanci, *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*, 8th editio. Elsevier, 2013.
- [17] "Dentes." [Online]. Available: <http://www.abcdamassagem.com.br/anatomia/s-dig03.htm>. [Accessed: 01-Jan-2017].
- [18] K. Masthan, *Textbook of Human Oral Embryology, Anatomy, Physiology, Histology and Tooth Morphology*. Jaypee, 2010.
- [19] "Como curar as suas cáries naturalmente." [Online]. Available: <http://comsaude.blogs.sapo.pt/tag/carie+dentaria>. [Accessed: 02-Feb-2017].
- [20] E. Kidd and O. Fejerskov, *Essentials of Dental Caries*, Fourth edi. Oxford University Press, 2016.
- [21] R. H. Selwitz, A. I. Ismail, and N. B. Pitts, "Dental caries," *Lancet*, vol. 369, pp. 51–59, 2007.
- [22] M. Lenander-Lumikari and V. Loimaranta, "Saliva and dental caries.," *Adv. Dent. Res.*, vol. 14, pp. 40–47, 2000.
- [23] W. J. Loesche, "Role of Streptococcus mutans in human dental decay.," *Microbiol. Rev.*, vol. 50, no. 4, pp. 353–380, 1986.
- [24] J. A. Cury, L. Maria, and A. Tenuta, "Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?," *Cariol. Braz Oral Res*, vol. 23, no. 1, pp. 23–30, 2009.
- [25] A. Rao, *Principles and Practice of Pedodontics*, 3rd editio. Jaypee, 2012.
- [26] Y. Wang, P. Spencer, and M. P. Walker, "Chemical profile of adhesive / caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy," 2006.
- [27] S. Domejean, R. Ducamp, S. Léger, and C. Holmgren, "Resin infiltration of non-cavitated caries lesions: A systematic review," *Med. Princ. Pract.*, 2015.
- [28] S. Paris and H. Meyer-Lueckel, "Inhibition of caries progression by resin infiltration in situ," *Caries Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 47–54, 2010.
- [29] *Introducing Icon ® The revolutionary treatment for incipient caries and white*

spots...without drilling! Englewood.

- [30] S. Paris, F. Schwendicke, J. Keltsch, C. Dorfer, and H. Meyer-Lueckel, "Masking of white spot lesions by resin infiltration in vitro," *J. Dent.*, vol. 41, 2013.
- [31] R. Belli, C. Rahiotis, E. W. Schubert, L. N. Baratieri, A. Petschelt, and U. Lohbauer, "Wear and morphology of infiltrated white spot lesions," *J. Dent.*, vol. 39, pp. 376–385, 2011.
- [32] S. Kim, E. Y. Kim, T. S. Jeong, and J. W. Kim, "The evaluation of resin infiltration for masking labial enamel white spot lesions," *Int. J. Paediatr. Dent.*, vol. 21, pp. 241–248, 2011.
- [33] R. Gelani, A. Zandona, F. Lippert, M. Kamocka, and G. Eckert, "In Vitro Progression of Artificial White Spot Lesions Sealed With an Infiltrant Resin," *Oper. Dent.*, vol. 39, no. 3, 2014.
- [34] E. Okuno and E. Yoshimura, *Física das Radiações*. Oficina de Textos, 2010.
- [35] "Espectro Electromagnético." [Online]. Available: <http://slideplayer.com.br/slide/10823194/>.
- [36] E. L. Alpen, *Radiation Biophysics*, 2nd ed. Academic Press, Inc., 1998.
- [37] J. Turner, *Atoms, Raditation and Raditation Protection*, 3rd ed. Wiley, 2007.
- [38] P. Suetens, *Fundamentals of Medical Imaging*, 2nd ed. Cambridge University Press, 2009.
- [39] A. Webb, *Introduction to Biomedical Imaging*. Wiley Inter-Science, 2003.
- [40] "Dispersão de Compton - Efeito de Compton." [Online]. Available: <http://absorcaoderaiosx.weebly.com/dispersatildeo-de-compton---efeito-de-compton.html>.
- [41] E. M. Yoshimura, "Física das Radiações: interação da radiação com a matéria Radiation Physics : interaction of radiation with matter," vol. 3, no. 1, pp. 57–67, 2009.
- [42] L. Scaff, *Física da Radioterapia*. Sarvier, 1997.
- [43] L. Karlsson, "Caries Detection Methods Based on Changes in Optical Properties between Healthy and Carious Tissue," *Int. J. Dent.*, vol. 2010, p. 270729, 2010.
- [44] V. Armengol, A. Jean, R. Rohanizadeh, and H. Hamel, "Scanning Electron Microscopic Analysis of Diseased and Healthy Dental Hard Tissues after Er : YAG

- Laser Irradiation : In Vitro Study," vol. 25, no. 8, pp. 2–5, 1999.
- [45] S. S. Atsu, P. S. Aka, H. C. Kucukesmen, M. A. Kilicarslan, and C. Atakan, "Age-related changes in tooth enamel as measured by electron microscopy: Implications for porcelain laminate veneers," vol. 94, no. 4, pp. 3–8.
 - [46] T. Uzunov, T. Uzunov, R. Grozdanova, and D. Kosturkov, "Diagnosis of dentin caries - Ultraviolet fluorescence," *Acta Medica Bulg.*, vol. 41, no. 2, pp. 55–60, 2014.
 - [47] C. M. Zakian, A. M. Taylor, R. P. Ellwood, and I. A. Pretty, "Occlusal caries detection by using thermal imaging," *J. Dent.*, vol. 38, no. 10, pp. 788–795, 2010.
 - [48] C. Zakian, I. Pretty, and R. Ellwood, "Near-infrared hyperspectral imaging of teeth for dental caries detection.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 6, p. 64047, 2009.
 - [49] A. D. G. Rodrigues and J. C. Galzerani, "Espectroscopias de infravermelho , Raman e de fotoluminescência : potencialidades e complementaridades," *Rev. Bras. Ensino da Física*, vol. 34, no. 4, 2012.
 - [50] K. a Schulze, M. Balooch, G. Balooch, G. W. Marshall, and S. J. Marshall, "Micro-Raman spectroscopic investigation of dental calcified tissues.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 69, no. 2, pp. 286–293, 2004.
 - [51] C. Wulfman, M. Sadoun, and M. L. De Chapelle, "Interest of Raman spectroscopy for the study of dental material : The zirconia material example," *IRBM*, vol. 31, no. 5–6, pp. 257–262, 2010.
 - [52] J. M. Silveira, S. Longelin, D. Mata, and M. L. Carvalho, "Identification of oxygen in dental enamel following tooth bleaching using confocal micro Raman spectroscopy," no. June, 2012.
 - [53] J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira, and S. Pessanha, "Study of the effects of unsupervised over-the counter whitening products on dental enamel using μ - Raman and μ -EDXRF spectroscopies," no. August, 2015.
 - [54] D. M. Wieliczka, P. Spencer, and M. B. Kruger, "Raman mapping of the dentin/adhesive interface," *Appl. Spectrosc.*, vol. 50, no. 12, pp. 1500–1504, 1996.
 - [55] M. Miyazaki, H. Onose, and B. K. Moore, "Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy," *Dent. Mater.*, vol. 18, no. 8, pp. 576–580, 2002.
 - [56] R. Parthasarathy, G. Thiagarajan, X. Yao, Y. P. Wang, P. Spencer, and Y. Wang, "Application of multivariate spectral analyses in micro-Raman imaging to unveil

- structural/chemical features of the adhesive/dentin interface," *J Biomed Opt*, vol. 13, no. 1, p. 14020, 2008.
- [57] M. Ribeiro *et al.*, "Diagnóstico não invasivo de tecidos dentários através da utilização da espectroscopia raman," vol. 5, no. c, 2001.
 - [58] A. C.-T. Ko *et al.*, "Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. June, p. 31118, 2005.
 - [59] I. Ionita, "Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy," *Rom. Reports Phys.*, vol. 61, no. 3, pp. 567–574, 2009.
 - [60] A. C.-T. Ko, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong, B. Cleghorn, and L.-P. Choo-Smith, "Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system," *Opt. Express*, vol. 16, no. 9, pp. 6274–6284, 2008.
 - [61] V. Bulatov, L. Feller, Y. Yasman, and I. Schechter, "Dental Enamel Caries (Early) Diagnosis and Mapping by Laser Raman Spectral Imaging," *Instrum. Sci. Technol.*, vol. 36, no. 3, pp. 235–244, 2008.
 - [62] H. Salehi *et al.*, "Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy," *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 10, pp. 765–774, 2012.
 - [63] A. Almahdy *et al.*, "Microbiochemical analysis of carious dentine using raman and fluorescence spectroscopy," *Caries Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 432–440, 2012.
 - [64] B. Coello, M. López-Álvarez, M. Rodríguez-Domínguez, J. Serra, and P. González, "Quantitative evaluation of the mineralization level of dental tissues by Raman spectroscopy," *Biomed. Phys. Eng. Express*, vol. 1, no. 4, p. 45204, 2015.
 - [65] C. Krafft, "Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 4, p. 40801, 2012.
 - [66] D. Pappas, B. W. Smith, and J. D. Winefordner, "Raman spectroscopy in bioanalysis," *Talanta*, vol. 51, no. 1, pp. 131–144, 2000.
 - [67] P. J. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, 2011.
 - [68] R. Hinrichs and M. Vasconcellos, "Espectroscopia micro-Raman," .
 - [69] "What Is Raman Spectroscopy and How Does It Work?" [Online]. Available: <https://oceanoptics.com/measurementtechnique/raman/>. [Accessed: 03-Feb-2017].

- [70] P. Rostron, P. Rostron, S. Gaber, and D. Gaber, "Raman Spectroscopy , a review Raman Spectroscopy , Review," vol. 869, no. November, pp. 50–64, 2016.
- [71] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. 2005.
- [72] T. Dieing, O. Hollricher, and J. Toporski, *Confocal Raman Microscopy*. Springer, 2010.
- [73] S. M. M. de Oliveira, "Avaliação Do Envelhecimento Da Pele Por Espectroscopia Raman." [Online]. Available: <http://univapcascavel.blogspot.pt/>. [Accessed: 03-Feb-2017].
- [74] R. Ramakrishnaiah *et al.*, "Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, no. 4, pp. 332–350, 2014.
- [75] A. Carden and M. D. Morris, "Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review)," *J. Biomed. Opt.*, vol. 5, no. 3, pp. 259–268, 2000.
- [76] A. P. Morais, I. P. R. Souza, and O. Chevitarese, "An in situ study of human enamel after titanium tetrafluoride application," *Pesq Odont Bras*, vol. 14, no. 2, pp. 137–143, 2000.
- [77] L. J. Walsh and F. Shakibaie, "Ultraviolet-induced fluorescence: Shedding new light on dental biofilms and dental caries," *Aust. Dent. Pract.*, no. January, 2007.
- [78] I. Panayotov *et al.*, "In vitro investigation of fluorescence of carious dentin observed with a Soprolife camera," *Clin. Oral Investig.*, vol. 17, no. 3, pp. 757–763, 2013.
- [79] M. Mukhin, a. Sklyarov, V. B. Dhuru, and V. V. Yakovlev, "<title>Fluorescence and Raman microscopy analysis of dental tissues</title>," vol. 5687, pp. 9–15, 2005.
- [80] S. Paris, H. Meyer-Lueckel, and A. M. Kielbassa, "Resin Infiltration of Natural Caries Lesions," *J. Dent. Res.*, vol. 86, no. 7, pp. 662–666, 2007.
- [81] W. Hill and V. Petrou, "Detection of caries and composite resin restorations by near-infrared Raman spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, vol. 51, no. 9, pp. 1265–1275, 1997.

Apêndice I

Tabela A.I.1 – Composição da resina composta e da resina hidrofóbica utilizadas.

Material	Componentes	%
Resina Composta Tetric EvoFlow®	BIS-GMA	
	UDMA	
	Decanodioldimetacrilato	37,6%
	Óxidos	
	Sílica	41,1%
	Pré-polímeros	20,4%
	Aditivos, catalisadores e estabilizadores	0,9%
	Pigmento	< 0,01%
Resina Hidrofóbica Optibond® FL	BIS-GMA	
	HEMA	10-30%
	Borosilicato de alumínio e bário	
	Sílica	
	Glicerol dimetacrilato	
	Disódio hexafluorosilicato	1-5%
	Canforquinona	

Apêndice II

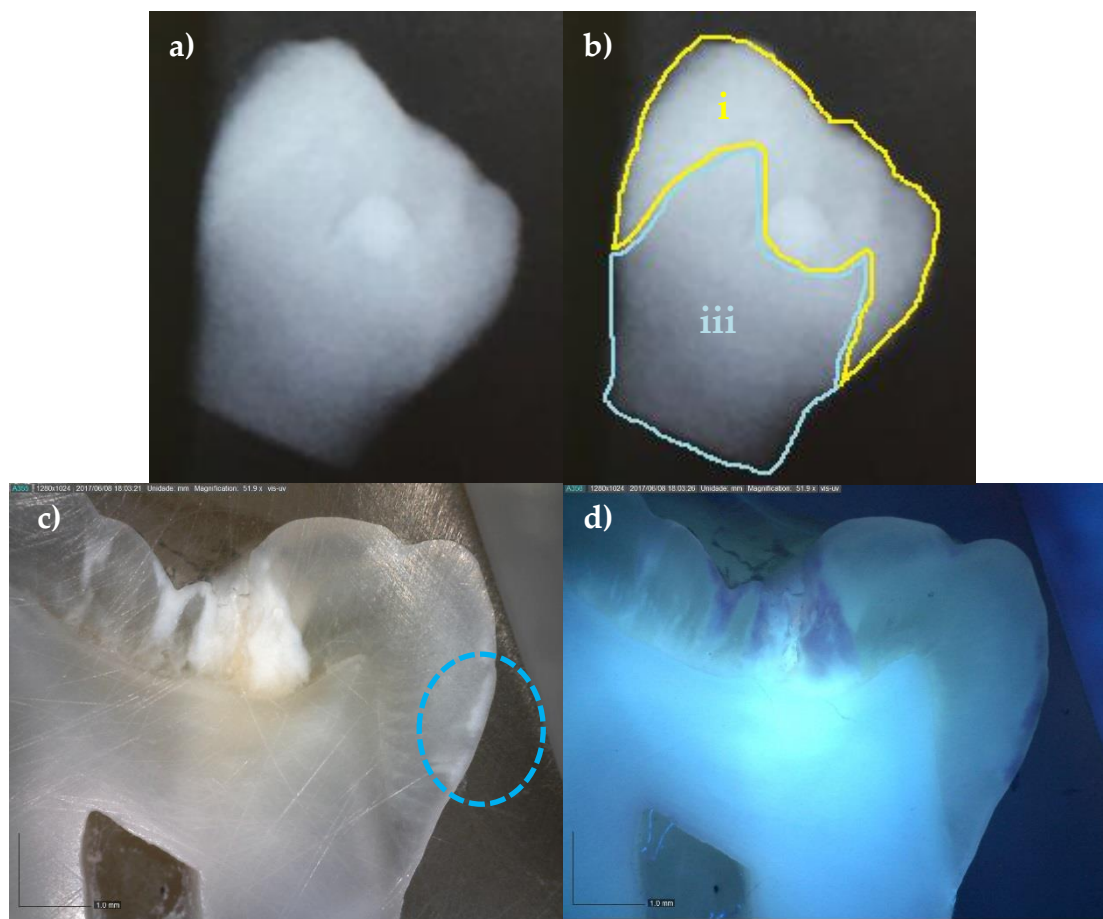


Figura A.II.1 – Imagens adquiridas para o espécime A3 com lesão branca assinalada por círculo azul. a) Radiografia; b) radiografia analisada de forma a indicar as estruturas: i) esmalte; e iii) dentina. c) imagem adquirida por MD; d) imagem adquirida por microscópio digital por meio de luz branca e e) imagem adquirida por microscópio digital através de luz UV.

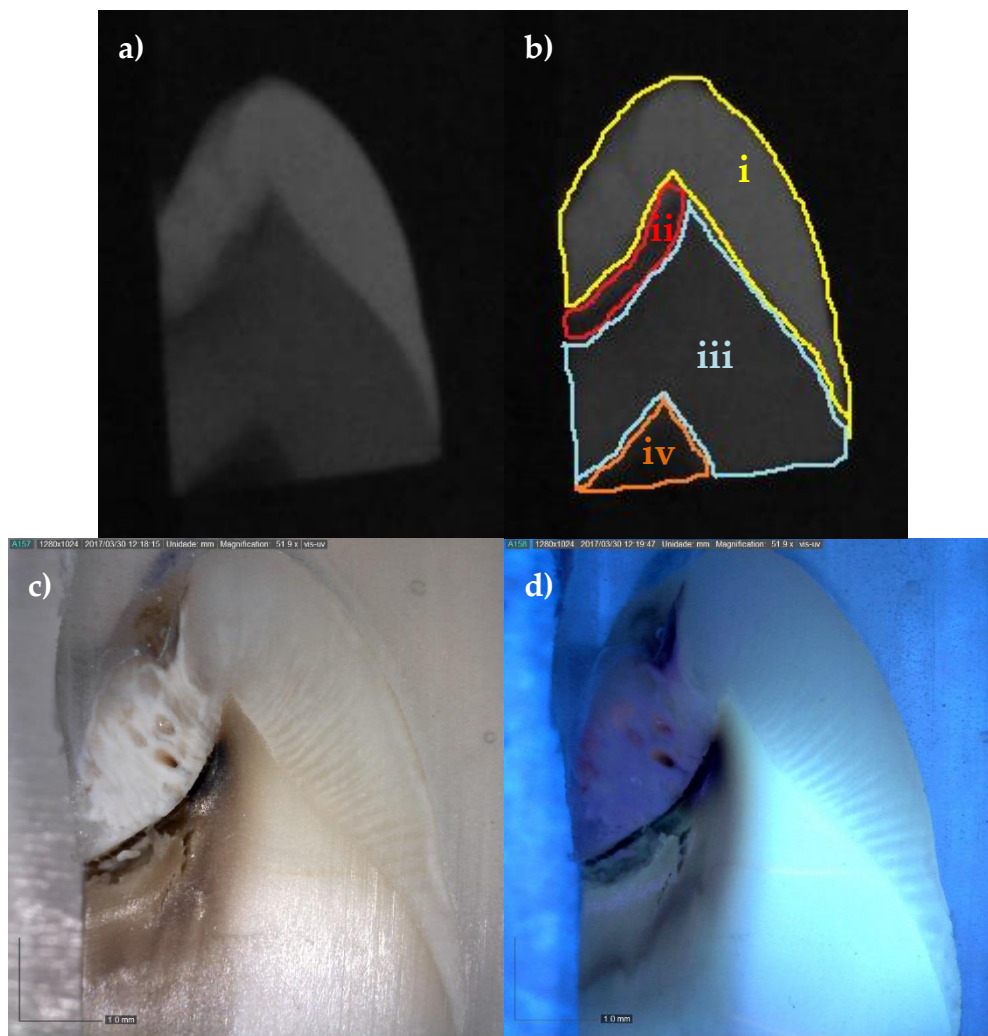


Figura A.II.2 – Imagens adquiridas para o espécime A8. a) Radiografia; b) radiografia analisada de forma a indicar as estruturas: i) esmalte; ii) dentina infectada iii) dentina sã e iv) cavidade pulpar; c) imagen adquirida por MD; d) imagem adquirida por microscópio digital por meio de luz branca e e) imagem adquirida por microscópio digital através de luz UV.

Apêndice III

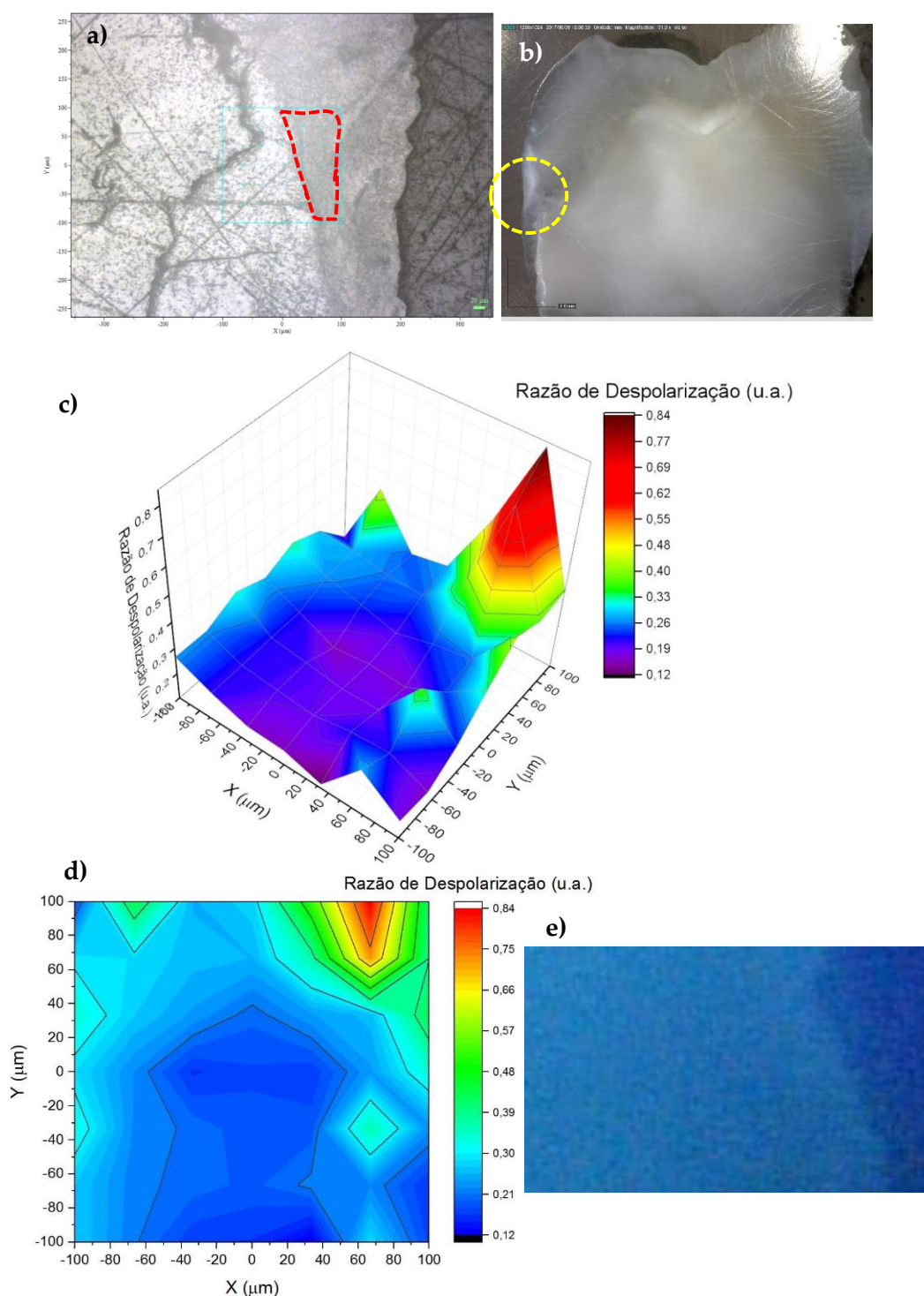


Figura A.III.1 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra A2 em que a) representa a grelha onde foi realizado um mapa de 7x7 espectros com tracejado vermelho a indicar a zona onde se esperaria um aumento da RD; b) a imagem adquirida por microscópio digital da amostra com a representação a tracejado amarelo da zona onde foi feito o mapa; c) a representação 3D da RD obtida; d) o respectivo mapa de contorno e e) imagem adquirida por MD com iluminação UV da região da lesão ampliada.

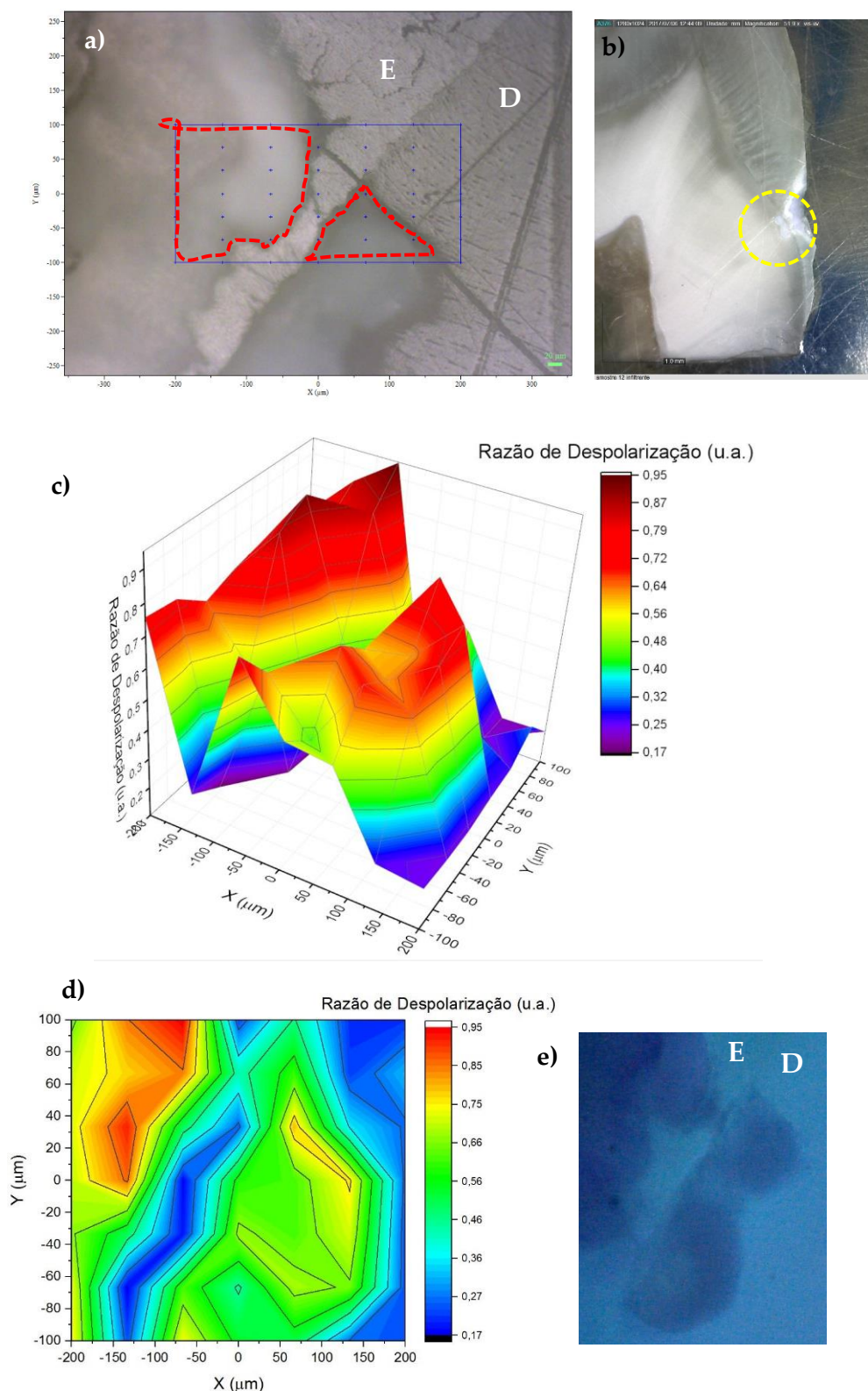


Figura A.III.2 – Mapeamento realizado por espectroscopia Raman na amostra B2 em que a) representa a grelha onde foi realizado um mapa de 7x7 espectros com tracejado vermelho a indicar a zona onde se esperaria um aumento da RD e as letras E e D a indicar o esmalte e a dentina, respectivamente; b) a imagem adquirida por MD da amostra com a representação a tracejado amarelo da zona onde foi feito o mapa; c) a representação 3D da RD obtida; d) o respectivo mapa de contorno e e) imagem adquirida por MD com iluminação UV da região da lesão ampliada.

Apêndice IV

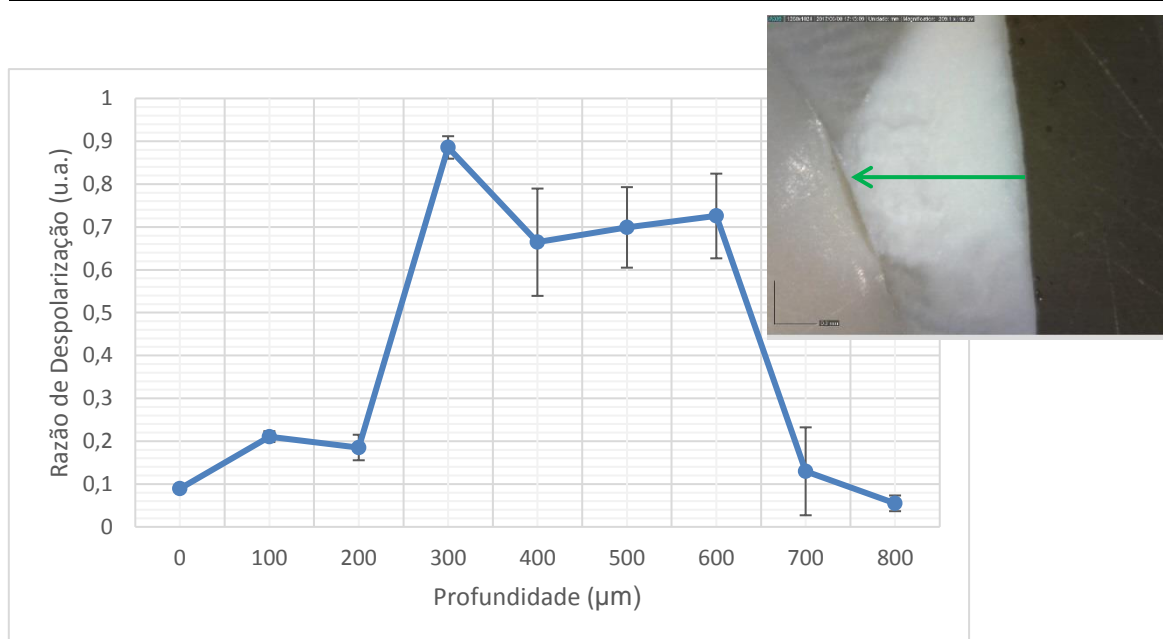


Figura A.IV.1 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A1 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

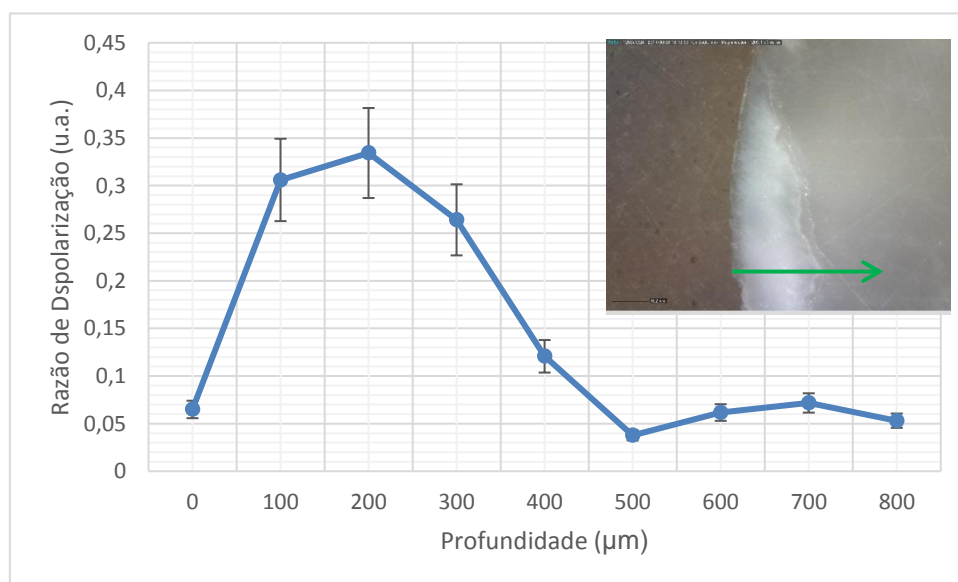


Figura A.IV.2 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A2 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

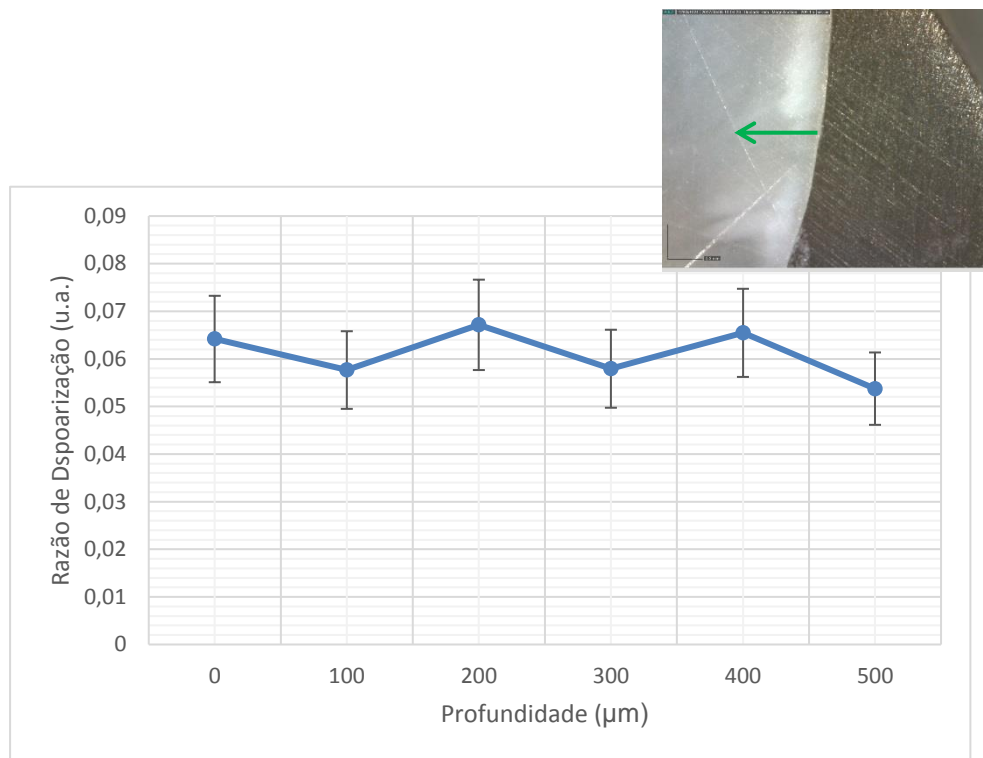


Figura A.IV.3 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A3 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão do tipo *white spot*. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

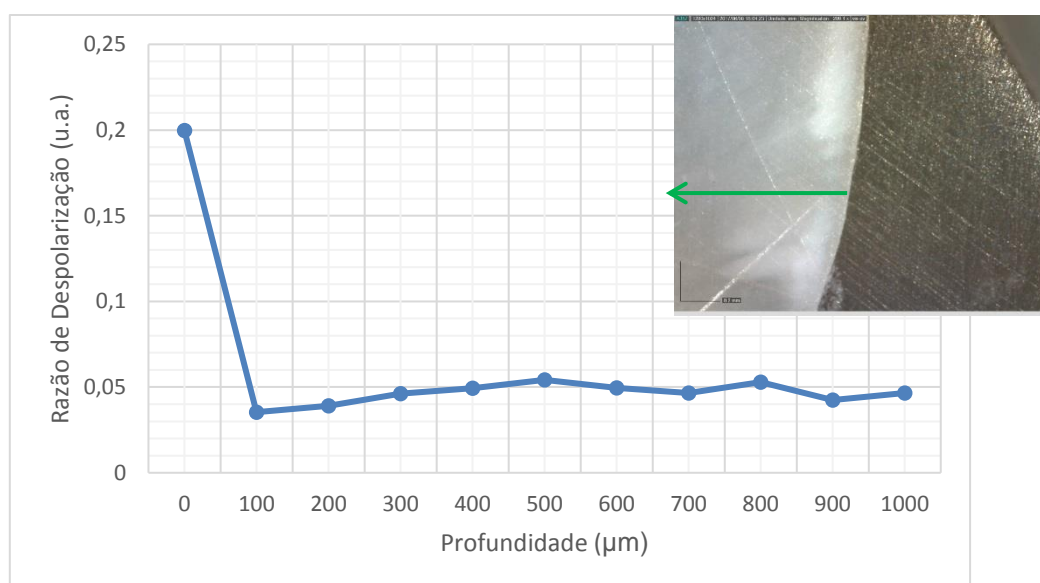


Figura A.IV.4 – Representação gráfica da RD calculada para um conjunto de espectros obtidos em linha para a amostra A3 na região indicada pela seta verde na imagem da lesão do tipo *white spot*. As incertezas dos valores foram calculadas com recurso ao método da propagação das incertezas para a operação divisão considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

Apêndice V

Todos os espectros representados neste apêndice foram adquiridos por espectroscopia Raman segundo os seguintes parâmetros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela.

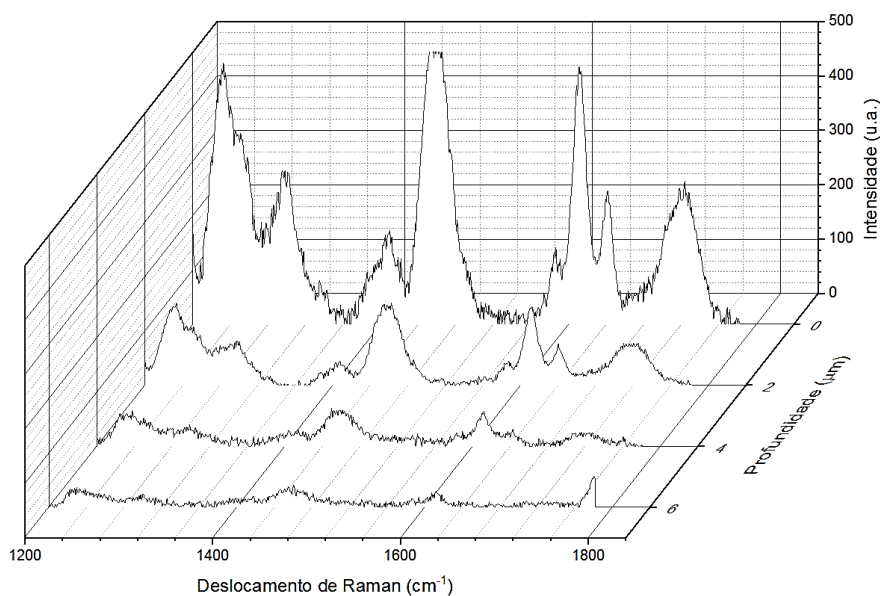


Figura A.V.1 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha A da amostra B1 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

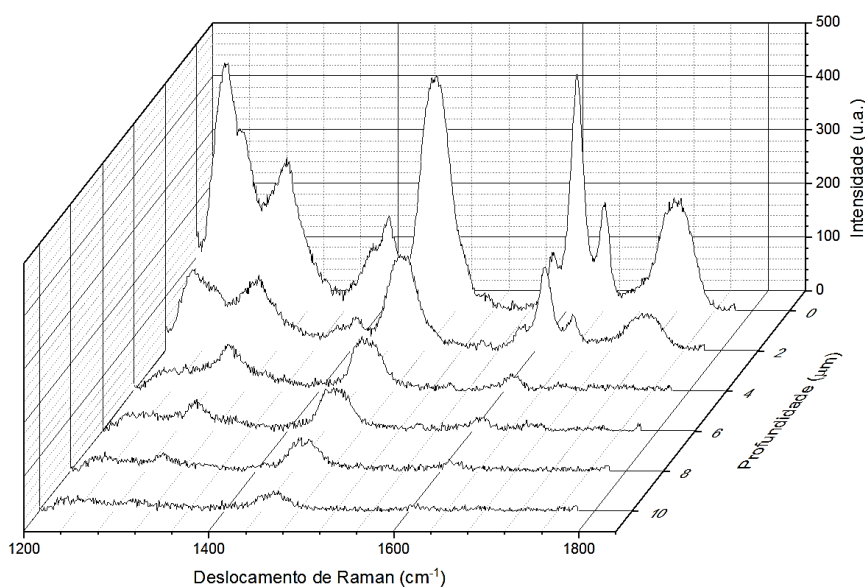


Figura A.V.2 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B1 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

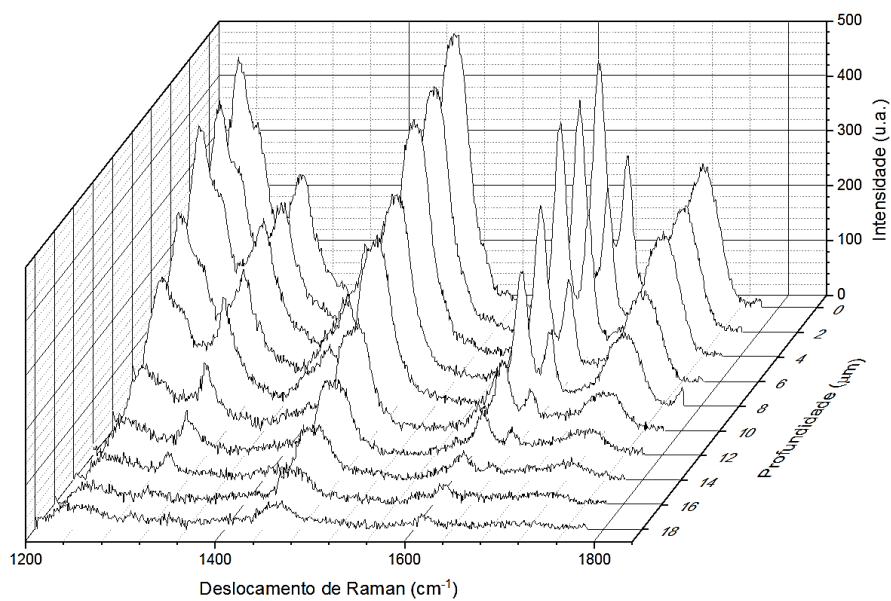


Figura A.V.3 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha C da amostra B2 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

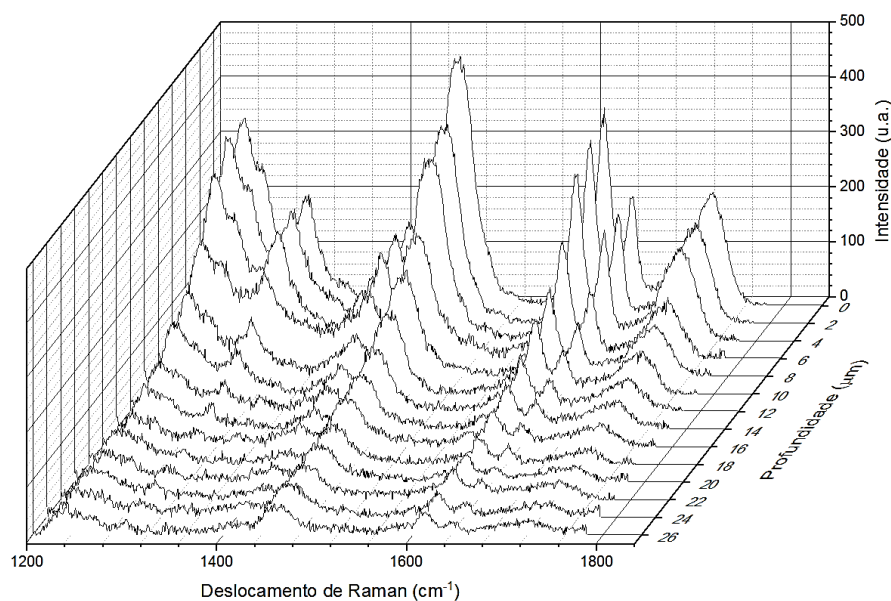


Figura A.V.4 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha D da amostra B2 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

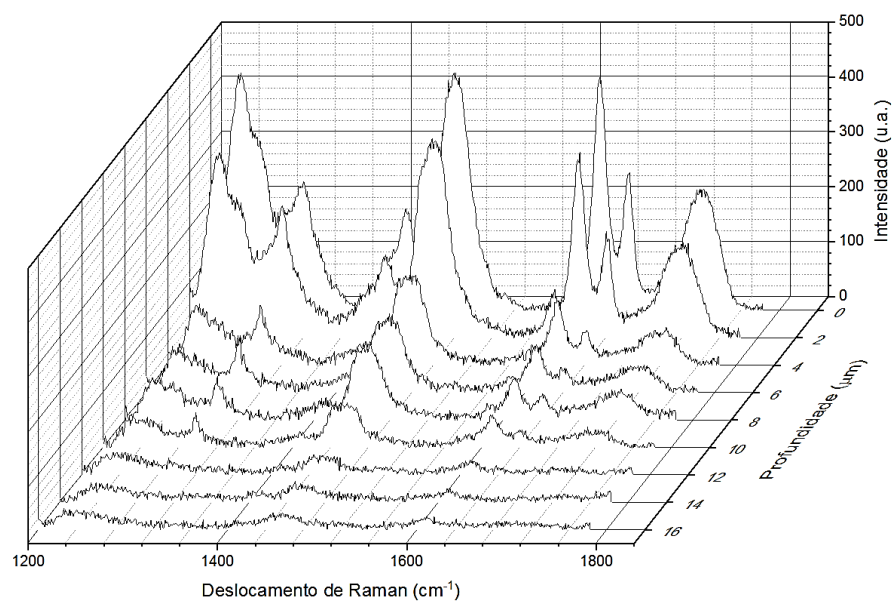


Figura A.V.5 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha E da amostra B2 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

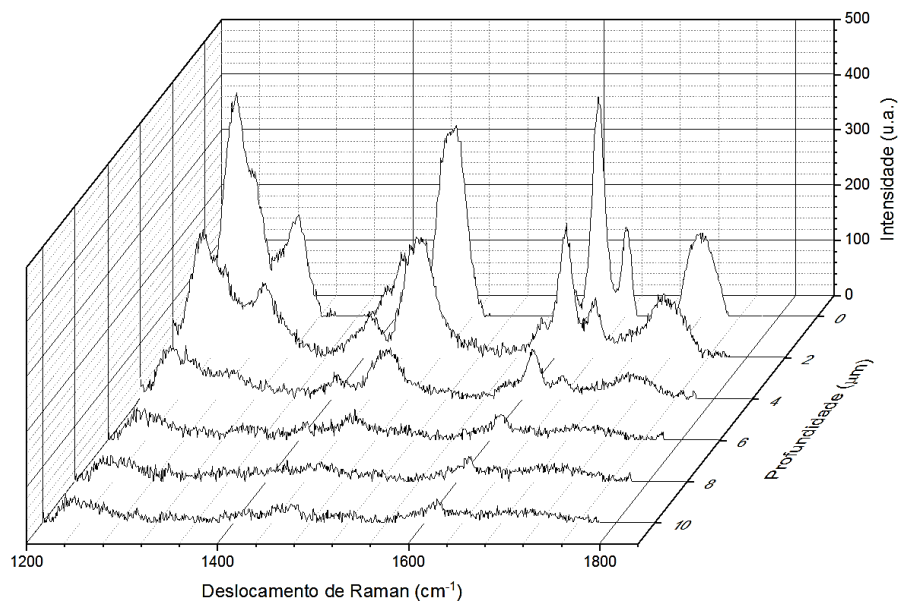


Figura A.V.6 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha A da amostra B3 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

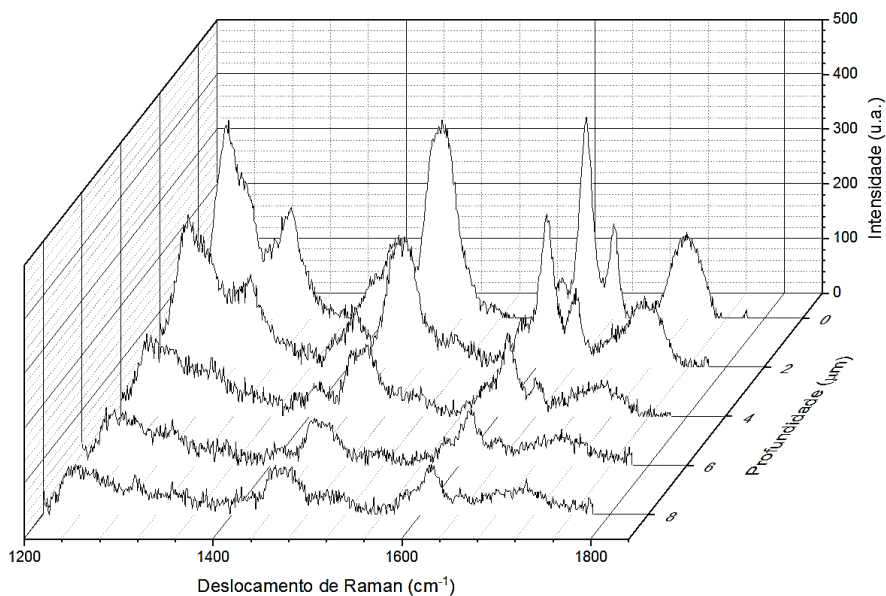


Figura A.V.7 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha B da amostra B3 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

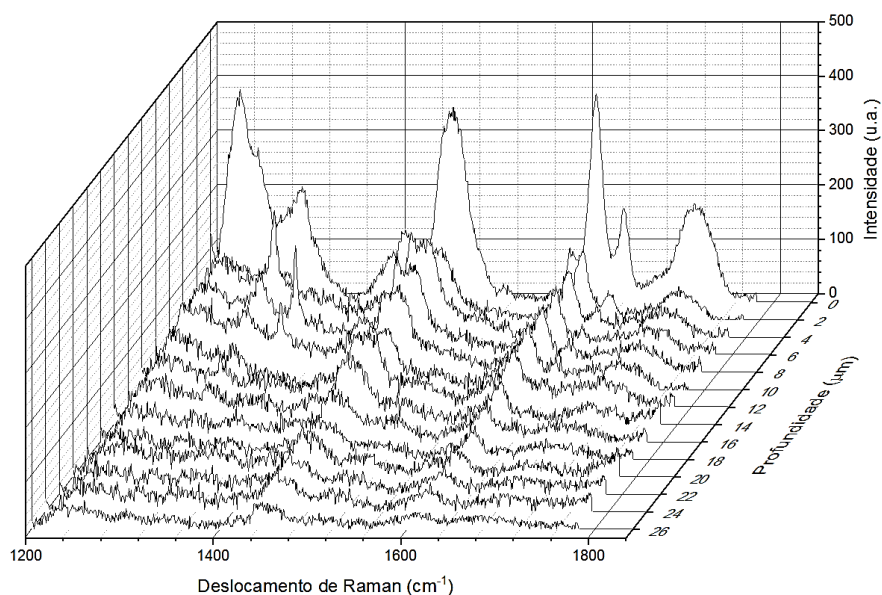


Figura A.V.8 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha C da amostra B3 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

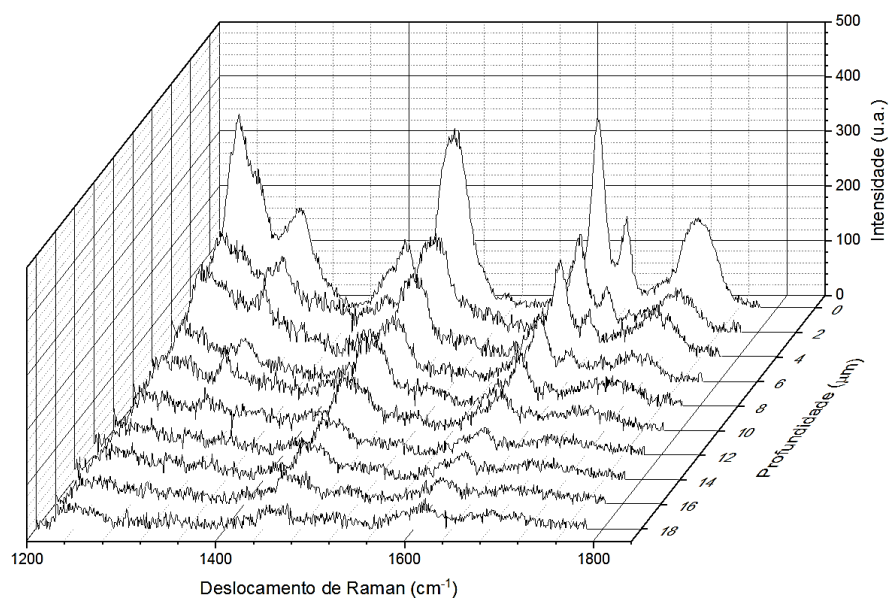


Figura A.V.9 – Comparação em cascata dos espectros obtidos para a linha E da amostra B3 (Parâmetros de aquisição dos espectros: Laser 785 nm; Filtro 50%; 10x15 s; polarização paralela).

